

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/108, 39/00, 39/35 // (A61K 39/108, 39:00) (A61K 39/108, 39:00) (A61K 39/35, 39:108)	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/39029 (43) Date de publication internationale: 11 septembre 1998 (11.09.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00030 (22) Date de dépôt international: 5 mars 1998 (05.03.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700199 5 mars 1997 (05.03.97) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES [BE/BE]; Avenue F.D. Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUCHATEAU, Jean [BE/BE]; Rue des Champs-Elysées 60, B-1050 Bruxelles (BE). SERVAIS, Geneviève [BE/BE]; Chemin de la Noire Agasse 2, B-7060 Horrues (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: PHARMACEUTICAL OR FOOD COMPOSITION FOR TREATING PATHOLOGIES RELATED TO GRAFT VERSUS HOST, ALLERGIC OR AUTOIMMUNE REACTION (54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU ALIMENTAIRE POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES A UN REJET DE GREFFE, UNE REACTION ALLERGIQUE OU AUTO-IMMUNE (57) Abstract The invention concerns a pharmaceutical and/or food composition comprising a suitable pharmaceutical and/or food vehicle and a heat shock protein and at least conformation or sequential epitopes of an antigenic structure inducing a graft versus host, an allergic or autoimmune reaction. (57) Abrégé La présente invention concerne une composition pharmaceutique et/ou alimentaire comprenant un véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire adéquat ainsi qu'une protéine de stress et au moins un des épitopes conformationnel ou séquentiel d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune.		

MAR 31 2000 13:16

ATTORNEY DOCKET NUMBER 8449-025-999
SERIAL NUMBER: 09/393,652
REFERENCE: A1

PHARMACEUTICAL OR FOOD COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF PATHOLOGIES
CONNECTED WITH TRANSPLANT REJECTIONS, AN ALLERGIC REACTION, OR AN
AUTOIMMUNE REACTION

Purpose of the Invention

This invention pertains to a new pharmaceutical or food composition intended for the treatment of pathologies connected with transplant rejections, allergic reactions, or autoimmune reactions.

Technological Background Underlying the Invention

For some twelve years, controlled studies have been describing desensitization based on the oral administration of allergens (1). This method is based on the fact that the oral administration of an antigen facilitates the acquisition of an immunological tolerance to the antigen. The digestive tract constitutes the means of the organism's contact with antigens, either of food or microbial origin. However, allergic reactions are rare. The oral administration of sheep red blood cells (SRBC) to rats prevents the rats from later producing anti-SRBC antibodies following a subcutaneous injection, whereas without any prior oral administration, the allergic response would have occurred. This phenomenon constitutes, from an immunological standpoint, what is called oral tolerance.

This method of oral desensitization has been validated in controlled prospective studies and makes it possible to reduce the risk of anaphylaxy, particularly for birch pollen and mites. It is already available on the vaccine market in a drinkable form (sold by the company Laboratoire des Stallergènes, Paris).

Furthermore, one can consider that the benefit in terms of the protection of newborns against allergy to milk, which has been discovered since the introduction of new formulas of enzymatically predigested powdered milk, would result from the induction of immunological tolerance by introducing the antigens in the form of peptides.

It is difficult, however, to predict or observe the efficacy of desensitization. Clinical observation is capable of determining whether an improvement in the symptoms has been achieved or not, after the fact.

We know from international patent application W096/36880 that it is possible to detect and/or quantify ligands specific to a pathology connected with an allergic response, an autoimmune response, or lung cancer using a competition test between the ligands present in a sample with other discriminatable ligands. This test is based on the fact that the allergic and symptomatic subjects recognize different epitopes by their antibodies from those recognized by the antibodies of tolerant subjects with the same specific antigen of said pathology. This document furthermore describes the possibility of measuring the change in this

specificity, particularly in the case of children allergic to milk, and the change toward acquiring a tolerance to milk in vivo.

Purpose of the Invention

The purpose of this invention is to provide a new composition that may be either a pharmaceutical or food composition aimed at modifying the immune response of patients with regard to a pathology connected with an allergic reaction, an autoimmune reaction, or in connection with transplant rejection phenomena, in such a way that the immune response of said patients approximates the natural tolerance manifested by normal subjects (who remain asymptomatic even though they are likely to be exposed to the pathology).

This invention is also aimed at providing a low-cost pharmaceutical or food composition that is easy to administer and which can be used prophylactically and/or therapeutically.

Characteristic Features of the Invention

This invention refers to a pharmaceutical or food composition comprising an adequate pharmaceutical or food vehicle, a stress protein (also referred to as a "heat shock protein" or HSP), and at least one of the (conformational or sequential) epitopes of an antigen structure, with said antigen structure inducing a transplant rejection, an allergic reaction, or an autoimmune reaction. The pharmaceutical or food vehicle of the composition is preferably adequate for administration by mucosal route (specifically, by oral route) or cutaneous route.

Preferentially, the stress protein and the epitope form a complex by natural means (that is, without the formation of a covalent bond) as described by Roamn et al., Febs (1994), Fouri et al., The Journal of Biological Chemistry, Volume 269 no. 48, p. 30470-30478 (1994), Palleros et al., The Journal of Biological Chemistry, Volume 269 no. 48, p. 13107-13114 (1994), Grageroov and Gottesman, Journal of Molecular Biology, no. 241, p. 133-135 (1994), and Schmid et al., Science, Volume 260, p. 1991 (1994) incorporated below by reference.

According to the invention, the epitope (also referred to as the antigen determinant) is obtained by hydrolysis of said antigen structure, preferably of the enzymatic type and particularly with pepsin.

In an advantageous manner, the stress protein is a bacterial stress protein, for example, that is present in saprophytic bacteria such as E. coli.

Among the stress proteins of this invention, we can mention the GroEL stress protein, the GrpE, DnaK, or DnaJ stress proteins as described by Hendrick and Hartl (Annual Review of Biochemistry, no. 62, p. 349 (1993)), or heat shock proteins (HSP) 60, 70, etc.

The term "transplant rejection phenomenon, allergic reaction, or autoimmune reaction" refers to the immediate or delayed hypersensitivity reactions caused by contact, particularly with an

allergen (this reaction may be immediate and specific (anaphylaxy, rash, etc.) or delayed) or autoimmune diseases and immune system disorders of the immediate or delayed type connected with transplant rejections in which the host rejects the transplant and vice versa.

Autoimmunity is a state of immunization of a subject against the subject's own substances, and the transplant rejection phenomenon is a state of a subject's immunization against foreign substances (bodily fluids such as blood, cerebrospinal fluid, etc., cells, tissues, organs, antibodies, etc.) voluntarily implanted in the patient. These phenomena are observed in particular in the pathologies chosen from among the group consisting of infections related to SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease), the Gougerot-Sjögren syndrome (or Sjögren's disease), and rheumatoid arthritis, as well as pathologies such as sarcoidosis and osteopenia, spondylarthritis, scleroderma, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, hyperthyroidism, Addison's disease, autoimmune hemolytic anemia, Crohn's disease, Goodpasture's syndrome, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, idiopathic purpura, insulin-dependent diabetes, myasthenia, pemphigus vulgaris, pernicious anemia, poststreptococcal glomerulonephritis, psoriasis, and spontaneous sterility, as well as the immediate or delayed phenomena observed with transplant rejections.

The term "antigenic structure inducing a transplant rejection, an allergic reaction or autoimmune reaction" refers to allergens, preferably those chosen from among the group consisting of the major allergic antigens present in foods such as eggs, soy beans, milk, particularly bovine beta-lactoglobulin (BLG) coming from cow's milk; the major allergic antigens present in plants, molds, medications (particularly antibiotics), pollens, major allergic antigens present in animals, particularly in hair, venom, particularly wasp venom; major antigens of the allergic reaction to mites, to mites present in house dust (antigen P1 Dermatophagoides pteronyssinus); the major antigen of Aspergillus fumigatus, and staphylococcal enterotoxin B (SEB).

Other non-limiting examples of allergens or mixtures of allergens have also been described in publication ISBN-91-970475-5-4 by Pharmacia AB, incorporated herein by reference.

The "antigenic structure" can also be an antigenic complex inducing an autoimmune disease. This antigenic structure is preferably specific to lupus (SLE) or Sjögren's disease, particularly the plasmatic membrane or a portion of this membrane containing membrane DNA having a weight greater than 100 KD, such as described, for instance, in patent application W096/13723 whose publication number is incorporated by reference.

Other non-limiting examples of antigenic complexes inducing autoimmune diseases have also been described by I.M. Roitt (Essential Immunology, Blackwell Scientific Publication (Ch. 14), ISBN 0-632-01994-8) and by R.L. Humbel (Auto-antibodies and autoimmune diseases, Ed. Scientifiques Elsevier (1994), ISBN 2-906077-58-5).

This antigenic structure can also be a major locus of

histocompatibility (MHC I and/or MHC II) or a portion thereof specific to an individual and participating in transplant rejection phenomena (including transfusions of bodily fluids).

The adequate pharmaceutical or food vehicle according to this invention can be any additive or medium, such as a non-toxic compatible substance for administering the composition according to the invention to a patient. The type of adequate pharmaceutical or food vehicle used will depend on the chosen means of administration. In particular, for oral administration, these vehicles may consist of aqueous solutions, syrups, tablets, capsules, etc. Other pharmaceutical vehicles such as cremes or ointments may be chosen depending on the type of administration, particularly for cutaneous administration.

Specialists in the field may also adapt the pharmaceutical vehicle depending on whether administration is subcutaneous, intradermal, intravenous, intramuscular, parenteral, by nasal or oral inhalation, etc.

The percentage of active compound present in the composition of this invention will depend on the type of patient and pathology being treated, and the administration route. The doses will only be limited by the patient's tolerance for the product, as well as by the frequency of administration.

The administration concentrations shall be chosen in such a way that the signs and symptoms of the aforementioned pathologies are reduced, and preferably eliminated, by the administration doses called for by the dosage regimen.

Quite unexpectedly, the Inventors discovered that the use of the pharmaceutical and/or food composition of this invention makes it possible to modify a patient's immune response induced by said antigenic structure. The modification of a patient's immune response can, for instance, be detected and quantified according to the process and technique described in patent application WO96/36880 or by any other method for clinically analyzing the patient undergoing treatment (including prophylactically) known to specialists in the field.

Another aspect of this invention concerns the use of the composition of this invention for preparing a medication intended to modify the immune response of a patient to an antigenic structure inducing a transplant rejection, an allergic reaction, or autoimmune reaction. In particular, this invention refers to the use of the pharmaceutical and/or food composition of the invention for preparing a medication intended for the desensitization of atopic and non-atopic allergies.

Another aspect of this invention concerns the use of the pharmaceutical and/or food composition of the invention for preparing a medication intended for the prevention or treatment of allergic reactions, the aforementioned autoimmune diseases, the treatment or prevention of transplant rejection, possibly in combination with a specific product to decrease or neutralize the allergic reactions, autoimmune reactions and transplant rejection phenomena (particularly the administration of immunosuppressors such as azathioprine, steroids, anti-lymphocyte globulins,

cyclosporin A, rapamycin, KF-506 (Tacrolimus), or lymphokins (particularly IL-10), their analogs, and their agonists well known to specialists in the field.

The term "analogs and agonists" of these molecules refers to other molecules or derivatives of these molecules acting on the same receptor or via the same mechanism of action as the aforementioned specific products.

This invention also concerns a process of therapeutic or prophylactic treatment of a patient consisting of a stage in which the composition of the invention is administered to said patient in order to modify the patient's immune response to an antigenic structure inducing a transplant rejection, an allergic reaction, or an autoimmune reaction.

This invention will be described in greater detail in reference to the figures described in the embodiment examples given below.

Examples

A. Basis for the Model under Consideration

a) Use of the Oral Route

Oral administration makes possible an induction of immunological tolerance and is applied more and more extensively in the field of allergy desensitization. However, it requires the use of larger quantities of antigen than by the parenteral route and must extend over periods of at least several years (2, 3). The optimization of the regimen of doses and their frequency can be adapted by specialists in the field so as to avoid syndrome reactions (replication of the allergic symptomatology in the event of an overdose), which occur frequently but are not dangerous on account of the gradual increases in the administered doses (2).

b) Use of Peptide-Protein Stress Complexes

Stress proteins (heat shock proteins, HSP) constitute a series of families of proteins that are very well preserved during evolution from bacteria to man and which have the capacity to bind to peptides or proteins whose conformational structure is altered or in the process of final conformation (4).

They have several roles, including participation in the intracellular transport leading to polypeptide assembly for the synthesis of certain proteins or their elimination. Some of them are expressed to the surface of different cells and may contribute to the antigenic presentation, particularly to T-lymphocytes having receptors for gamma-delta type antigens, which colonize the mucous membranes and lymphoid organs associated with the digestive mucous membrane.

Antigenic presentation by means of HSPs belonging to the family HSP70, to gamma-delta (γ , δ) T-lymphocytes makes it possible to do without the presentation dependent upon the major type-II

histocompatibility complex.

Parenteral injection of HSP-peptide complexes in experimental animals makes it possible to achieve a remarkable adjuvant effect (5, 6) thus bringing about or amplifying the antigenic power of these peptides.

Certain HSPs from bacteria belonging to families HSP60 and HSP70 are the target of immune responses whose role is to protect against infection by these germs.

It was recently proposed that desensitization be performed by oral route by giving peptide extracts from *E. Coli* containing HSP60 to patients suffering from rheumatoid arthritis, with some beneficial effect (5, 6). Considering the minimal side effects, the authors suggest that the test be tried on other inflammatory afflictions in order to manipulate a response directed against one of these microbial HSPs itself, considered to be a substitute for an auto-antigen.

Quite unexpectedly, the Inventors discovered that the stress proteins acted as a remarkable vector for presenting peptides to the lymphoid systems of the digestive tract, and for inducing tolerance. The stress proteins of saprophytic bacteria seem to be the most abundant naturally in the digestive cavity. It is also likely that the peptides coming from the digestion of food constitute the most abundant mass of antigenic fragments available for the formation of HSP-peptide complexes. Still, the abundance of peptides generated and the presumed limited quantity of bacterial HSPs makes the formation of an immunologically effective quantity of these HSP-peptide antigenic complexes unreliable, especially since the absorbed quantity of antigen aimed at desensitizing is very small (a few tens of μg) compared to the mass of food protein.

The Inventors proposed that the formation of these complexes be promoted prior to arriving in the digestive tract, that is, *in vitro*, by using purified stress proteins of *E. Coli* and peptides coming from the pepsin digestion of BLG.

c) Use of Competition Tests Between Serum and Monoclonal Antibodies for BLG

The two monoclonal antibodies referred to hereinafter as M6 and M7 each recognize a different conformational epitope on the BLG molecule. Their different qualitative properties are used as recognition markers of singular epitopes in competition with all of the serum antibodies of a subject. Clinical studies demonstrate that symptomatic subjects and asymptomatic subjects recognize epitopes on this molecule which, at least for a portion, are different (7), something which will be called epitopic profiles below.

The epitope recognized by M6 is particularly well recognized by allergic and symptomatic subjects. The fixation of the M6 antibody to the intact BLG is indeed inhibited better by the serums of children allergic to milk than by those of non-allergic subjects, whether they are healthy children or adults (blood donors).

The epitope recognized by M7 is better recognized by asymptomatic subjects than by allergic subjects. The fixation of antibody M7 to the BLG is better inhibited by asymptomatic subjects than by allergic subjects.

The antigenic bond competition against M6 is used as a specificity index representing the profile of epitopes recognized by allergic subjects and, conversely, the competition against M7 as a specificity index representing the profile of epitopes recognized by asymptomatic subjects.

The validation of this interpretation was given over time by clinical studies. The acquisition of a state of tolerance to milk is accompanied by a conversion of the fine specificity of the serum antibodies toward the profile typical of asymptomatic subjects.

This discrimination of epitopes expressed to the mass of circulating antibodies is what serves as the analysis tool for influencing the oral antigen modulation.

B. Experimental Model

Syngeneic mice were given very small quantities of peptides coming from the pepsin digestion of beta-lactoglobulin (BLG) either previously coupled or not with purified stress proteins whose functional capacity was intact (capacity to bond with peptides or altered proteins) in their drinking water.

a) Animal Origin and Breeding Conditions

Forty animals aged 8 to 16 weeks were taken from a stock of Balbc mice given a food supply poor in cow's milk for several generations: 30 µg of beta-lactoglobulin/gram of nutritional pellets.

b) Preparation of Antigenic Complexes

The BLG was digested in contact with pepsin coupled with agarose (Sigma) under incomplete digestion conditions, then filtered with a 10,000-Dalton filter. The concentration of the digestion product (pB) was measured using spectrophotometry (yield of 30 to 50% of the protein intact).

Phosphate buffer solutions (PBS) of 1 µg/ml were incubated with solutions of 1 µg/ml of the following stress proteins of E. Coli: DnaK, DnaJ, GroEL, and GrpE (Stressgen) for at least one hour at ordinary temperature. Aliquots of 1 ml of each combination were frozen.

c) Treatment Groups and Dosage Regimens of Complexes by Oral Route

A solution of complexes (1 ml) was added, after thawing, to the 100-ml water bottle given daily to each cage of four mice. Each type of complex was administered to 8 mice. A control group was given the non-complexed pB antigen.

The solution was added 3 times per week for two weeks (that

is, six times) starting with time zero.

d) Antibody Response

An individual sampling of blood was taken from the retro-orbital plexus at time zero and after 4 weeks. The animals were anesthetized with ether and their blood removed after 8 weeks.

The specificity of the serum antibodies was examined by means of an ELISA competition test.

e) Antibody Specificity Test using Competition

Multiple-well polystyrene plates were passively covered with a small quantity of BLG (0.3 µg/ml in bicarbonate buffer) through absorption at ordinary temperature, then saturated with gelatin (1%, weight/vol - Haemacel (R)).

The mouse serum was diluted to 1:100 in a dilution buffer (PBSdil) consisting of: PBS-EDTA (10 mM) - Tween 20 (0.05% - gelatin (Haemacel - 1%).

Two monoclonal mouse antibodies produced were selected for their specificity to conformational epitopes of BLG. They were biotinylated and used at their antigenic fixation limit dilution defined in the following way: the dilution that enables a maximum signal but sensitive to any reduction of the antigen content at its own dilution, and inhibitable through competition with a pool of sera from untreated mice. Indeed, the untreated mice produce natural antibodies against the BLG on account of the antigenic exposure in the food, albeit minimal.

A quantity of 100 µl of diluted serum and biotinylated antibodies are mixed in a well in duplicate.

After an incubation period of one night at ordinary temperature, fixation of the monoclonal antibody is measured according to the proportional retention of biotin revealed through collection of streptavidin coupled with horseradish peroxidase. The peroxidase colors a substrate with orthophenylene diamine. The optical density (OD) is measured using spectrophotometry. The background noise (b.n.) is measured in wells not containing antigen. The maximum fixation is defined either in the absence of competition (monoclonal antibody alone) or in the presence of serum having a particularly low inhibition.

The results are expressed as a percentage of inhibition of the fixation of monoclonal antibodies by: $\% \text{ inhib} = 100 \times (\text{OD of the test} - \text{OD b.n.}) / (\text{maximum OD} - \text{OD b.n.})$.

The correspondence between the profile of epitopes recognized on the antigen and the clinical state of the subject (tolerance or not) is confirmed by other examples:

- mite allergy model:

- the evolution of the fine specificity of anti-mite antibodies in allergic children demonstrates the existence of a profile of epitopes under the effect of the desensitization induced both by parenteral and oral route,

- the evolution of the antibodies

g) Results

Figure 1 summarizes the experimentation data:

Inhibition of M6 Antibody

On the left portion are shown the changes in the inhibition averages (+ standard deviation) of the fixation of monoclonal M6 antibodies by individual sera for the various treatment groups.

The figures are reiterated in Table 1.

The control group being given the peptides digested with pepsin (pB) experienced an increase from 45% to 60% and then 59% in its average inhibition capacity after 4 and 8 weeks. This change is significant ($p < 0.05$ - paired T-test) compare to the start, but stable after 4 weeks.

For the group being given the DnaK-pB complexes, this capacity goes from 48% to 56% and then 77% over the same period, with the latter being greater than in the control group ($p < 0.01$ - unpaired T-test) and very significant compared to time zero ($p < 0.001$ - paired T).

Likewise, the groups being given the DnaJ-pB, GroEL-pB, and GrpE-pB complexes experience a very significant increase after 4 weeks, which grows stronger by the eighth week (well above the value of the control group for the GroEL-pB and GrpE-pB complexes at the same time).

Inhibition of M7 Antibody

On the left portion of Figure 1 are shown the changes in the inhibition averages (+ standard deviation) of the fixation of monoclonal M7 antibodies by individual sera for the various treatment groups.

The figures are reiterated in Table 2.

The control group being given the peptides of pepsin-digested BLG (pB) have an average inhibition capacity that decreases from 70% to 52% and then 57% after 4 and 8 weeks. This change is significant ($p < 0.01$ - paired T-test) although stable after 4 weeks.

For the group being given the DnaK-pB complexes, this capacity is already reduced significantly by the fourth week, going from 68% to 51%, as in the control group.

But the results drop to 17% by the eighth week ($p < 0.01$ - paired T), which is clearly lower than the control group for the corresponding sampling ($p < 0.01$ - T-test not paired).

The change is parallel to that of the group treated with the DnaJ-pB complexes.

For the group being given GroEL-pB complexes, the reduction in the inhibiting power is maximum right from the start, reaching 28% in the fourth week and remaining at the same approximate level of 30% in the eighth week.

In the group being given GrpE-pB complexes, the reduction in the inhibiting power is also maximum right from the start, going

from 72% to 22% by the fourth week, but it seems to then diminish, returning to an average rate of 41%.

h) Conclusion

The administration of peptides resulting from the enzymatic digestion of a major antigen of milk, i.e., beta-lactoglobulin, in the form of complexes bound to stress proteins according to the invention, and by oral route, brings about a radical and very quick modification in the profile of the epitopes recognized by the circulating antibodies. These antibodies are naturally present in all subjects exposed to the antigen by their food. In a model of mice exposed chronically to a small quantity of the antigen by this route, the dose of antigen administered during a brief lapse of time is very low, far below the quantity ingested naturally (estimated at 0.25 µg per subject per day of treatment in the form of complexes, and 150 µg per subject per day in normal food).

The speed of the change is all the more remarkable in that the half-life of the serum antibodies, primarily IgG, is 3 weeks, which means that by the eighth week there should still remain one fourth of the antibodies present at the end of just 2 weeks of treatment. All the stress proteins used were effective. In a second experiment with DnaK-pB complexes, an attempt to determine the lower dose limit was unsuccessful, even though doses ten times smaller were used (0.1 µg per 100-ml bottle 3 days per week).

C. Orally-Induced Tolerance to Major Histocompatibility Antigens

1. Experimental Model

Syngeneic animals (Balbc mice) were given a protein preparation dissolved in their drinking water. It contained fragments of histocompatibility antigens from syngeneic mice of another strain, from which they would reject any transplant (C3H mice).

The tolerogenic effect is expected to be strengthened when these fragments are associated with a bacterial stress protein (in this case DnaK from E. Coli).

For control purposes, a group of mice was similarly given a DnaK complex with peptide fragments, obtained by similar means, from beta-lactoglobulin (major milk antigen).

One should expect the oral sensitization to specifically attenuate the lymphocyte reactivity with regard to a strain of foreign lymphocytes of the same type as those used for the oral preparation, and not with regard to a third, unrelated strain.

2. Apparatus and Method

a) Animals:

Three groups of 12 mice were taken from a stock of syngeneic mice of the Balbc strain raised in cages of 6 animals each. For 2 weeks,

each group was given one of the following preparations in the drinking water bottle at a rate of 3 distributions per week (every other day but not on week ends) and a dose of 1 μ g of complex for 100 ml of water:

- a complex of Dnak-peptides of beta-lactoglobulin (control preparation)
- a solution of spleen lymphocyte membrane peptides from C3H mice digested with pepsin (containing fragments of histocompatibility antigens)
- a complex of these peptides associated with purified Dnak of E. Coli (Stressgen).

b) Acquired Tolerance Test (in vitro)

This test is based on a mixed unidirectional lymphocyte culture.

Responding cells are isolated from the spleen of the animals to be tested. The lympho-monocyte cells are obtained after density-gradient centrifuging with a mixture of ficoll-isopaque (Pharmacia). They are resuspended with the help of 4 million cells/ml in an RPMI 1640 culture medium buffered with Hepes and bicarbonate, supplemented with 2-mercaptoethanol, glutamine, geomycin, and 10% veal serum.

The stimulating cells are obtained in the same way from mice of different strains with regard to their MHC: the C3H strain and a domestic strain (DOM).

They are incubated for one hour in the presence of mitomycin in order to block their multiplication potential. They are then resuspended under the same conditions as the responding cells.

Lymphocyte Culture:

Equal volumes of suspension (0.1 ml) of responding cells and stimulating cells are mixed in three mixes in round-bottomed wells in multiple-well culture plates made of polystyrene, and are then incubated for 5 days in a humidified air/CO₂ incubator (95/5% vol/vol), 37.5°C.

Each microculture well is given 2 μ C of thymidine tritium-marked at 2 C/mM (Amersham) 16 hours prior to stoppage of the culture, which is done by means of a Mash II device which filters each microculture through a fiberglass membrane that holds back the cell nuclei.

The nuclear radioactivity of each sediment, which reflects the incorporation of thymidine novo into the DNA, is measured by liquid scintillation counting (Packard Tricarb).

The results are expressed in Hits Per Minute and represent the average of 3 samples of the same culture on the individual level.

c) Experiment Scheme

The samples are taken at two different times:

- during the third week following the start of oral administration of one of the preparations

- during the seventh week.

The animals are sacrificed in 3 stages per period.

Each culture experiment includes two animals per treated group.

The mixed lymphocyte culture is made at the same time:

a) for the mitomycinated cells of C3H origin

b) for the mitomycinated cells of DOM origin.

d) Preparation of the Peptides

Lymphocytes (20 million) of a strain of appropriate mouse are isolated from the spleen. This is a mixture of T- and B-lymphocytes in approximately equal proportions and therefore carrying type I and type II antigens. They are treated with ultrasound (3 x 10 seconds) and then centrifuged at 1000 g for 10 minutes. The supernatant liquid is collected and centrifuged again in the same manner. Next, the supernatant liquid is centrifuged twice at 8000 g. The last supernatant liquid is enriched with cell membranes and cleaned of cell nucleus debris and Golgi apparatus. It is then subjected to digestion with pepsin in combination with agarose beads at pH 2 in a glycine buffer for 1 hour and 30 minutes at 37°C. After mild centrifuging in order to separate out the agarose beads, and neutralization to pH 7 with a Tris buffer, the mixture is filtered with a filter (Millipore limit 10 kD). The yield is in the vicinity of 500 µg of peptide (determined by spectrophotometry) referred to as LMp.

A solution of 50 µg of peptide is mixed with a solution of 50 µg of Dnak (Stressgen) to form a Dnak-LMp complex.

The Dnak complex with beta-lactoglobulin peptide (Bp) is made in the same way using peptides coming from the pepsin digestion of purified beta-lactoglobulin (see above).

3. Results

After 3 Weeks of Treatment (Figure 2)

The group of mice having received the Dnak-LMp complex does not respond as well to stimulation with mitomycinated C3H cells (C3Hm).

This is different ($p < 0.02$; T-test) from the group that was given just the LMp peptide and also from the one given the control complex Dnak-Bp ($p < 0.01$; T-test).

Still, one must note that the administration of peptide alone (without Dnak) also has an effect, since this group is significantly less responsive than the control group ($p < 0.01$; T-test).

However, the specificity of the response inhibition is guaranteed by the fact that the lymphocyte reactivity of the three groups to mitomycinated cells from a third, unrelated strain (DOMm) is comparable.

After 7 Weeks (Figure 3), i.e., 4 Weeks After Stoppage of Oral Administration

The difference between the three groups remains quite clear. The group treated with Dnak-LMp is the most inhibited compared both to the one having received just membrane peptide ($p < 0.02$; T-test) as well as the control group ($p < 0.01$; T-test).

The administration of peptide alone still provides a response attenuation compared to the control group ($p < 0.01$; T-test).

The specificity of the response is once again confirmed by the parallel test on the mitomycinated cells from an unrelated strain (DOMm) in which the three groups treated differently react in the same way.

The administration of peptides obtained through pepsin digestion of spleen lymphocytes from mouse strains characterized by an incompatibility in the H-2 system both on levels K and D as well as A-E in extremely small quantities and for two weeks has the effect of greatly attenuating the unconditional response of immunocompetent lymphocytes in vitro, which generally indicates this incompatibility.

This attenuation is reinforced by the formulation of this type of peptide in the form of peptide-Dnak complexes.

This attenuation is specific and does not affect in any way the ability to respond to a different variety not related to the strain used for inducing tolerance.

D. Tolerance of Syngeneic Mice to Allogenic Cell Transplants

1. Experimental Model and Plan

Strains of mice:

- Balbc for the animals made tolerant
- C3H for the animals providing (allogenic) cells for transplanting and stimulating cells in a mixed lymphocyte culture (MLC).

The mice are raised in cages of 6 animals each. Each group consists of 12 animals per treatment.

The oral treatment is done according to the foregoing protocol.

Experimental Scheme:

Complexes administered in the drinking water:

days 0, 2, 4, 7, 9

Allogenic transplant: 20×10^6 spleen cells from C3H intraperitoneally:

day 16

Sacrificing, collection of spleens, and cultivation of spleen cells:

15 weeks after the transplant

Detection and Counting of Allogenic Cells

a) By the presence of cells carrying type II MHC

Functional test in a mixed bidirectional syngeneic culture

The spleen cells of treated mice having undergone a transplant are cultivated with cells from untreated (unaffected) syngeneic (Balbc) mice.

Normally, no proliferative response is to be expected if the contents of the spleen cells from treated animals having undergone transplants consists solely of syngeneic cells.

However, the presence of allogenic cells, indicating that the transplant has taken in vivo, should bring about a proliferation of type MLC by the so-called non-tolerant untreated cells, which is in proportion to the number of foreign cells.

In order to assess the degree to which the transplant has taken, an attempt at a relative quantification of the response is made in reference to a dose/response curve obtained by adding increasing known quantities of allogenic C3H cells to an identical quantity of untreated responding cells (200×10^3 cells/well).

b) By the Presence of Cells Carrying Type I MHC

Direct counting by flow cytofluorometry immunofluorescence using a mouse monoclonal antibody specific to type I MHC from the C3H mouse: H-2 kk (Serotec) combined with fluorescein or with phycoerythrin in a suspension of spleen cells.

2. Results

As shown in Figure 4, 15 weeks after the peritoneal transplant, the spleen cells from the group treated with DnaK-peptide complexes from lympho-monocyte membranes of the C3H mouse are incapable of responding to stimulation by mitomycinated C3H cells. This indicates an induction of allogenic tolerance.

The group treated with just the peptide is also tolerant, but to a lesser degree.

The group treated with beta-lactoglobulin Dnak-peptide is not tolerant at all.

Furthermore, the mixed cultures stimulated with another allogenic population coming from a histoincompatible strain other than C3H are all comparable. This indicates that no treatment has altered or differentiated the MLC response capacity and that the effect of the treatment is indeed specific to the strain of mouse from which the membrane peptides came.

As shown in Figure 5, the MLC response of untreated animals not having undergone a transplant is used to reveal the existence of foreign cells in a mixture of spleen cells from animals having undergone transplants, which in this case would be of C3H origin.

It seems that the spleens of mice treated orally with Lmp and DnaK-Lmp prior to the transplant contain allogenic elements, since they give rise to a proliferative response that is very significantly different from the response of the control group treated with a complex of DnaK-irrelevant peptides (beta-lactoglobulin). The response of this group does not differ from the background noise.

For purposes of comparison, a series of mixed cultures was

performed simultaneously with increasing known quantities of C3H cells (Figure 6). They gave rise to a proliferative response proportional to the quantity of foreign cells.

The average level of response recorded with spleen cells from animals having undergone transplants and tolerance induction with DnaK-LMp complexes would correspond to a content of approximately 30% C3H cells.

The presence of cells of the transplanted type in the spleen is measured by immunofluorescence using an antibody specific to MHC I from C3H (H-2kk) (Table 5). The group treated with DnaK-LMp contains 14.7% on average, which is a significantly greater value than that of the two other groups.

This presence of allo-antigens can only be observed if the spleen cells from animals having undergone transplants are allowed to rest for at least one night at 37°C without any serum. This suggests that it is indispensable to allow the re-expression of these antigens whose presence would thus be modulated in vivo, probably by anti-H-2kk antibodies. This adds another mechanism of transplant tolerance to the tolerance directed purely at the responding T-cells.

Table 1

Inhibition of the monoclonal M6 antibody binding nBLG with individual mouse sera: change as a function of time according to the type of complex administered orally.

		% inhibition of the M6 bond		
		Average	Standard deviation	Number of cases
Group 1: Control (dBLG only)				
SAMPLE	1	45.0100	8.4146	8
SAMPLE	2	60.6750	3.9304	8
SAMPLE	3	59.6338	17.4714	8
Group 2: dBLG-DnaK complexes				
SAMPLE	1	48.4350	7.0540	8
SAMPLE	2	56.3675	5.6146	8
SAMPLE	3	77.0975	3.8966	8
Group 3: dBLG-				
SAMPLE	1	23.7350	15.3990	8
SAMPLE	2	65.7013	6.2958	8
SAMPLE	3	65.3863	4.7270	8
Group 4: dBLG-				
SAMPLE	1	24.9538	4.7972	8
SAMPLE	2	56.0100	4.3929	8
SAMPLE	3	80.0287	1.9401	8
Group 5: dBLG-				
SAMPLE	1	37.3313	6.4248	8
SAMPLE	2	56.6962	5.5641	8
SAMPLE	3	87.1525	7.8731	8

Table 2

Inhibition of the monoclonal M7 antibody binding nBLG with individual mouse sera: change as a function of time according to the type of complex administered orally.

		% inhibition of the M7 bond		
		Average	Standard deviation	Number of cases
Group 1: Control (dBLG only)				
SAMPLE	1	70.0658	3.5541	8
SAMPLE	2	52.8224	2.3458	8
SAMPLE	3	57.0592	7.8996	8
Group 2: dBLG-DnaK complexes				
SAMPLE	1	68.9145	2.6698	8
SAMPLE	2	51.6908	3.0857	8
SAMPLE	3	17.2697	8.0473	8
Group 3: dBLG-				
SAMPLE	1	78.4276	3.4832	8
SAMPLE	2	50.8553	3.9778	8
SAMPLE	3	26.9145	3.2069	8
Group 4: dBLG-				
SAMPLE	1	73.9671	3.1679	8
SAMPLE	2	28.5132	8.6072	8
SAMPLE	3	30.2829	14.2174	8
Group 5: dBLG-				
SAMPLE	1	72.8355	4.7722	8
SAMPLE	2	22.2961	9.5040	8
SAMPLE	3	41.3684	6.4331	8

Table 3

Titers of anti (native) nBLG antibodies after logarithmic conversion: change as a function of time according to the type of complex administered orally.

		Ln of titers (A.U.)		
		Average	Standard deviation	Number of cases
Group 1: Control (dBLG only)				
SAMPLE	1	3.8526	.4547	8
SAMPLE	2	4.2162	.3395	8
SAMPLE	3	4.2059	.2946	8
Group 2: dBLG-DnaK complexes				
SAMPLE	1	3.9738	.7957	8
SAMPLE	2	4.3749	.6353	8
SAMPLE	3	3.2562	.5057	8
Group 3: dBLG-				
SAMPLE	1	3.7073	.4435	7
SAMPLE	2	4.1348	.5475	8
SAMPLE	3	4.3917	.5047	8
Group 4: dBLG-				
SAMPLE	1	4.3714	.4215	8
SAMPLE	2	3.6419	.4704	8
SAMPLE	3	3.9964	.2724	8
Group 5: dBLG-				
SAMPLE	1	4.1526	.6401	8
SAMPLE	2	4.1739	.4464	8
SAMPLE	3	3.6126	.4873	8

Table 4

Differences in inhibition between the bonding of the M6 and M7 antibodies to nBLG:

		% inhibition of the bonding of M6 -% inhibition of the bonding of M7		
		Average	Standard deviation	Number of cases
Group 1: Control (dBLG only)				
SAMPLE	1	-25.0558	9.0035	8
SAMPLE	2	7.8526	5.6470	8
SAMPLE	3	2.5745	19.8676	8
Group 2: dBLG-DnaK complexes				
SAMPLE	1	-20.4795	8.5253	8
SAMPLE	2	4.6767	6.1131	8
SAMPLE	3	59.8278	9.2686	8
Group 3: dBLG-				
SAMPLE	1	-54.6926	13.8705	8
SAMPLE	2	14.8460	6.4665	8
SAMPLE	3	38.4718	5.6903	8
Group 4: dBLG-				
SAMPLE	1	-49.0134	3.9824	8
SAMPLE	2	27.4968	10.6337	8
SAMPLE	3	49.7459	14.6732	8
Group 5: dBLG-				
SAMPLE	1	-35.5043	4.8959	8
SAMPLE	2	34.4002	13.4093	8
SAMPLE	3	45.7841	8.7931	8

Table 5

Persistent allogenic cells (H-2kk +) in the spleens of Balbc mice having received transplants of C3H cells:

Oral Treatment					
DnaK-Bp		Lymphocyte Membrane peptide (LMp) only		DnaK-LMp	
1.0%		0.9%		14.2%	
1.5		2.8		25.0	
0.5		3.6		9.2	
0.5		3.7		10.4	
Average	St. Dev.	Average	St. Dev.	Average	St. Dev.
0.9%	0.5	2.7%	1.3	14.7%	7.2

Paired T-tests:

DnaK-LMp/DnaK-Bp: p = 0.026
DnaK-LMp/LMp: p = 0.052

REFERENCES

[already in English]

CLAIMS

1. A pharmaceutical and/or food composition comprising, with an adequate pharmaceutical and/or food vehicle, a stress protein and at least one of the conformational or sequential epitopes of an antigenic structure inducing a transplant rejection or an allergic reaction or an autoimmune reaction.

2. A pharmaceutical and/or food composition according to claim 1, characterized by the fact that the pharmaceutical and/or food vehicle is adequate for administration by mucosal route or by cutaneous route.

3. A pharmaceutical and/or food composition according to claim 1 or 2, characterized by the fact that the stress protein and the epitope form a complex.

4. A pharmaceutical and/or food composition according to any one of the foregoing claims, characterized by the fact that the epitope is obtained by an advantageously enzymatic hydrolysis, preferably with pepsin, of said antigenic structure.

5. A pharmaceutical and/or food composition according to any one of claims 1 through 4, characterized by the fact that the stress protein is a bacterial stress protein.

6. A pharmaceutical and/or food composition according to claim 5, characterized by the fact that the bacterial stress protein is a stress protein of a saprophytic bacterium.

7. A pharmaceutical and/or food composition according to either one of claims 5 or 6, characterized by the fact that the stress protein is a stress protein of *E. Coli*.

8. A pharmaceutical and/or food composition according to claim 7, characterized by the fact that the stress protein is chosen from among the group consisting of the GroEL, GrpE, DnaK, or DNAj stress proteins.

9. A pharmaceutical and/or food composition according to any one of the foregoing claims, characterized by the fact that the antigenic structure is an allergen chosen from among the group consisting of the major allergic antigens present in milk, particularly bovine beta-lactoglobulin (BLG) from cow's milk; the major allergic antigens present in plants, particularly in pollens, in animal hairs, in animal venoms, particularly in wasp venom; the major antigens of the allergic reaction to mites, to the mite present in household dust (antigen P1 of *Dermatophagoides pteronyssinus*); the major antigen of *Aspergillus fumigatus*, staphylococcal enterotoxin B (SEB); and the type I or II major histocompatibility locus.

10. A pharmaceutical and/or food composition according to any one of the foregoing claims, characterized by the fact that it includes an immunosuppressor, preferably chosen from among the group consisting of azathioprine, steroids, anti-lymphocyte globulins, cyclosporin A, rapamycin, KF506 (tacrolimus), or lymphokins, their analogs, their agonists, or a mixture thereof.

11. Use of the pharmaceutical and/or food composition according to any one of the foregoing claims for the preparation of a medication intended to modify the immune response of a patient to

an antigenic structure specific to a pathology related to transplant rejection, an allergic reaction, or an autoimmune reaction.

12. Use of the pharmaceutical and/or food composition according to any one of claims 1 through 9 for the preparation of a medication intended for the desensitization of atopic or non-atopic allergies.

13. Use of the pharmaceutical and/or food composition according to any one of claims 1 through 9 for the preparation of a medication intended to treat or prevent autoimmune diseases, particularly those pathologies chosen from among the group consisting of infections related to SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease), the Gougerot-Sjögren syndrome (or Sjögren's disease), and rheumatoid arthritis, as well as pathologies such as sarcoidosis and osteopenia, spondylarthritis, scleroderma, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, hyperthyroidism, Addison's disease, autoimmune hemolytic anemia, Crohn's disease, Goodpasture's syndrome, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, idiopathic purpura, insulin-dependent diabetes, myasthenia, pemphigus vulgaris, pernicious anemia, poststreptococcal glomerulonephritis, psoriasis, and spontaneous sterility.

14. Use of the pharmaceutical and/or food composition according to any one of claims 1 through 10 for the preparation of a medication intended to treat or prevent transplant rejection.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/108, 39/00, 39/35 // (A61K 39/108, 39:00) (A61K 39/108, 39:00) (A61K 39/35, 39:108)</p>	A2	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/39029</p> <p>(43) Date de publication internationale: 11 septembre 1998 (11.09.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00030</p> <p>(22) Date de dépôt international: 5 mars 1998 (05.03.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 9700199 5 mars 1997 (05.03.97) BE</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES [BE/BE]; Avenue F.D. Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles (BE).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUCHATEAU, Jean [BE/BE]; Rue des Champs-Elysées 60, B-1050 Bruxelles (BE). SERVAIS, Geneviève [BE/BE]; Chemin de la Noire Agasse 2, B-7060 Horrues (BE).</p> <p>(74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>
<p>(54) Title: PHARMACEUTICAL OR FOOD COMPOSITION FOR TREATING PATHOLOGIES RELATED TO GRAFT VERSUS HOST, ALLERGIC OR AUTOIMMUNE REACTION</p> <p>(54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU ALIMENTAIRE POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES A UN REJET DE GREFFE, UNE REACTION ALLERGIQUE OU AUTO-IMMUNE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a pharmaceutical and/or food composition comprising a suitable pharmaceutical and/or food vehicle and a heat shock protein and at least conformation or sequential epitopes of an antigenic structure inducing a graft versus host, an allergic or autoimmune reaction.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne une composition pharmaceutique et/ou alimentaire comprenant un véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire adéquat ainsi qu'une protéine de stress et au moins un des épitopes conformationnel ou séquentiel d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCI, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	IS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TC	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Vict Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU ALIMENTAIRE POUR LE
10 TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIÉES A UN REJET DE GREFFE, UNE
RÉACTION ALLERGIQUE OU AUTO-IMMUNE

Objet de l'invention

La présente invention est relative à une
15 nouvelle composition pharmaceutique ou alimentaire destinée
au traitement de pathologies liées à un rejet de greffe,
une réaction allergique ou auto-immune.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

20 Depuis une douzaine d'années, des études
contrôlées décrivent la désensibilisation reposant sur
l'administration orale d'allergènes (1). Cette méthode se
fonde sur le fait que l'administration orale d'un antigène
facilite l'acquisition d'une tolérance immunologique à son
25 égard. La voie digestive constitue le mode de contact de
l'organisme avec des antigènes, d'origine alimentaire ou
microbienne. Cependant, les réactions allergiques sont
rares. L'administration per os de globules rouges de mouton
(GRM) à des rats empêche ceux-ci de produire plus tard des
30 anticorps anti-GRM après une injection sous-cutanée, alors
que sans prise orale préalable, la réponse allergique eut
été présente. Ce phénomène constitue immunologiquement ce

que l'on appelle la tolérance orale.

Cette méthode de désensibilisation per os a été validée dans des études prospectives et contrôlées, et permet de réduire les risques d'anaphylaxie, en particulier
5 pour le pollen de bouleau et les acariens. Elle est déjà accessible sur le marché des vaccins par une présentation sous forme buvable (vendue par la société Laboratoire des Stallergènes - Paris).

Par ailleurs, on peut considérer que le
10 bénéfice en terme de protection de l'allergie au lait des nourrissons qui est constaté depuis l'introduction de nouvelles formules de laits en poudre prédigérés enzymatiquement résulterait de l'induction de tolérances immunologiques par la présentation des antigènes sous forme
15 de peptides.

Cependant, il est difficile de prédire ou constater l'efficacité de la désensibilisation. L'observation clinique permet, après coup, de constater ou non l'amélioration éventuelle des symptômes.

20 Il est connu par la demande de brevet internationale WO96/36880 de pouvoir détecter et/ou quantifier des ligands spécifiques d'une pathologie liée à une réponse allergique, auto-immune ou du cancer du poumon, par un test de compétition entre des ligands présents dans
25 un échantillon avec d'autres ligands discriminables. Ce test se base sur le fait que les sujets allergiques et symptomatiques reconnaissent par leurs anticorps des épitopes différents de ceux reconnus par les anticorps de sujets tolérants sur la même structure antigénique
30 spécifique de ladite pathologie. Ce document décrit en outre la possibilité de mesurer l'évolution de cette spécificité, en particulier dans le cas d'enfants

allergiques au lait, et l'évolution vers l'acquisition in vivo de la tolérance au lait.

Buts de l'invention

5 La présente invention a pour but de fournir une nouvelle composition qui peut être de type pharmaceutique ou alimentaire visant à modifier la réponse immunitaire de patients vis-à-vis d'une pathologie liée à une réaction allergique, auto-immune ou vis-à-vis de
10 phénomènes de rejet de greffe, de manière à ce que la réponse immunitaire desdits patients se rapproche de la tolérance naturelle manifestée par des sujets normaux (qui demeurent asymptomatiques bien que susceptibles d'être exposés aussi à cette pathologie).

15 La présente invention vise également à fournir une composition pharmaceutique ou alimentaire de faible coût, dont l'administration soit aisée et qui puisse être utilisée de manière prophylactique et/ou thérapeutique.

20

Éléments caractéristiques de l'invention

La présente invention concerne une composition pharmaceutique ou alimentaire comprenant un véhicule pharmaceutique ou alimentaire adéquat, une
25 protéine de stress (dénommée également "heat shock protein" ou HSP) et au moins un des épitopes (conformationnel ou séquentiel) d'une structure antigénique, ladite structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou une réaction auto-immune. De préférence, le
30 véhicule pharmaceutique ou alimentaire de la composition est adéquat pour une administration par voie mucosale (notamment par voie orale) ou cutanée.

Avantageusement, la protéine de stress et l'épitope forment un complexe de manière naturelle (c'est-à-dire sans formation de lien covalent) comme décrit par Roamn et al., Febs (1994), Fouri et al., The Journal of
5 Biological Chemistry, Volume 269 n° 48, pp. 30470-30478 (1994), Palleros et al., The Journal of Biological Chemistry, Volume 269 n° 48, pp. 13107-13114 (1994), Grageroov et Gottesman, Journal of Molecular Biology, n° 241, pp. 133-135 (1994), et Schmid et al., Science,
10 Volume 260, p. 1991 (1994) incorporés ci-dessous par référence.

Selon l'invention, l'épitope (dénommé également déterminant antigénique) est obtenu par une hydrolyse de préférence enzymatique, notamment à la
15 pepsine, de ladite structure antigénique.

De manière avantageuse, la protéine de stress est une protéine bactérienne de stress, par exemple présente dans les bactéries saprophytes telles que E. coli.

Parmi les protéines de stress de la présente
20 invention, on peut mentionner la protéine de stress GroEL, les protéines de stress GrpE, DnaK ou DnaJ telles que notamment décrites par Hendrick et Hartl (Annual Review of Biochemistry, n° 62, p. 349 (1993)) ou les heat shock proteins HSP 60, 70, ...

25 On entend par "phénomène de rejet de greffe, réaction allergique ou auto-immune", les réactions d'hypersensibilité de type immédiat ou différé provoquées pour le contact notamment avec un allergène (cette réaction peut être immédiate et spécifique (anaphylaxie, urticaire,
30 etc.) ou différée dans le temps) ou les maladies auto-immunes et les désordres du système immunitaire de type immédiat ou différé liés aux rejets de greffes de type hôte

contre greffe et greffe contre hôte.

L'auto-immunité est un état d'immunisation d'un sujet contre ses propres constituants et le phénomène de rejet de greffe est un état d'immunisation d'un sujet
5 contre des constituants étrangers (fluides corporels tels que sang, liquide céphalo-rachidien, ..., cellules, tissus, organes, anticorps, ...) implantés de manière volontaire chez le patient. Ces phénomènes sont en particulier observés dans les pathologies choisies parmi le groupe
10 constitué par les infections liées au SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease), le syndrome Gougerot-Sjögren (ou pathologie Sjögren), la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que les pathologies du type sarcoïdosis et osteopenia, la spondylarthrite, la scleroderma, la sclérose en plaques
15 (multiple sclerosis), la sclérose amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdisme, la maladie d'Addison, l'anémie hémolytique auto-immune, la maladie de Crohn, le syndrome de Goddpasture, la maladie de Graves, la thyroïdite d'Hashimoto, l'hémorragie purpurale idiopathique, les
20 diabètes insulino-dépendants, la myasthénie, le pemphigus vulgaris, l'anémie pernicieuse, le glomerulonephritis poststreptococcal, le psoriasis et la stérilité spontanée, ainsi que les phénomènes immédiats ou différés observés lors de rejets de greffe.

25 On entend par "structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune", des allergènes, de préférence choisis parmi le groupe constitué par les antigènes majeurs allergiques présents dans les aliments tels que les oeufs, le soja, le
30 lait, en particulier la bêta-lactoglobuline bovine (BLG), issue du lait de vache, les antigènes majeurs allergiques présents dans les végétaux, les moisissures, les

médicaments (en particulier les antibiotiques), les pollens, les antigènes majeurs allergiques présents dans les animaux, en particulier dans les poils, le venin, en particulier le venin de guêpe, les antigènes majeurs de la
5 réaction allergique aux acariens, à la mite présente dans la poussière de maison (antigène P1 Dermatophagoïdes pteronyssinus), l'antigène majeur de l'*Aspergillus fumigatus*, et l'entérotoxine B staphylococcace (SEB).

D'autres exemples non limitatifs d'allergènes
10 ou mélanges d'allergènes ont également été décrits dans la publication ISBN-91-970475-5-4 de Pharmacia AB incorporée ici par référence.

La "structure antigénique" peut également être un complexe antigénique induisant une maladie auto-
15 immune. De préférence, cette structure antigénique est spécifique du lupus (SLE) ou de la pathologie de Sjögren, en particulier la membrane plasmaticque ou une portion de cette membrane contenant du DNA membranaire ayant un poids supérieur à 100 KD, tel que notamment décrit dans la
20 demande de brevet WO96/13723 dont le numéro de publication est incorporé par référence.

D'autres exemples non limitatifs de complexes antigéniques induisant des maladies auto-immunes ont également été décrits par Roitt I. M. (Essential
25 Immunology, Blackwell Scientific Publication (ch. 14) ISBN 0-632-01994-8) et par Humbel R. L. (Auto-anticorps et maladies auto-immunes, Ed. Scientifiques Elsevier (1994) ISBN 2-906077-58-5).

Cette structure antigénique peut également
30 être un locus majeur d'histocompatibilité (MHC I et/ou MHC II) ou une portion de celui-ci spécifique d'un individu et intervenant dans les phénomènes de rejet de greffes (y

compris les transfusions de fluides corporels).

Le véhicule pharmaceutique ou alimentaire adéquat selon la présente invention peut être n'importe quel additif ou support, tel qu'une substance compatible
5 non toxique pour l'administration de la composition selon l'invention à un patient. Le type de véhicule pharmaceutique ou alimentaire adéquat utilisé dépendra du mode d'administration choisi. En particulier, pour l'administration orale, ceux-ci peuvent consister en des
10 solutions aqueuses, des sirops, des tablettes, des capsules, etc. D'autres véhicules pharmaceutiques tels que des crèmes ou des onguents peuvent être choisis en fonction du type d'administration, en particulier pour des administrations cutanées.

15 L'homme du métier peut également adapter le véhicule pharmaceutique en fonction d'une administration subcutanée, intradermale, intraveineuse, intramusculaire, parentérale, par voie d'inhalation nasale ou buccale, etc.

Le pourcentage de composé actif présent dans
20 la composition selon l'invention dépendra du type de patient et de pathologie traité et de la voie d'administration. Les doses seront uniquement limitées par la tolérance du produit par le patient, ainsi que par les fréquences d'administration.

25 Les concentrations d'administration seront en particulier choisies de manière à ce que les signes et symptômes des pathologies susmentionnées soient réduits, de préférence supprimés, par les doses d'administration prévues par la posologie.

30 De manière inattendue, les Inventeurs ont découvert que l'utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'invention permet

de modifier la réponse immunitaire d'un patient induite par ladite structure antigénique. La modification de la réponse immunitaire d'un patient peut notamment être détectée et quantifiée selon le procédé et la technique décrits dans la
5 demande de brevet WO96/36880 ou par toute méthode d'analyse clinique du patient traité (y compris de manière prophylactique) bien connue de l'homme du métier.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention
10 pour la préparation d'un médicament destiné à modifier la réponse immunitaire d'un patient vis-à-vis d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune. En particulier, la présente invention concerne l'utilisation de la composition
15 pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la désensibilisation d'allergies atopiques ou non atopiques.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique
20 et/ou alimentaire selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des réactions allergiques, des maladies auto-immunes susmentionnées, au traitement ou à la prévention de rejets de greffe, éventuellement en combinaison avec un produit
25 spécifique pour diminuer ou neutraliser les réactions allergiques, les réactions auto-immunes et les phénomènes de rejet de greffe (en particulier l'administration d'immunosuppresseurs tels que l'azathioprine, les stéroïdes, les globulines anti-lymphocitaires, la
30 cyclosporine A, la rapamycine, le KF-506 (tacrolimus) ou des lymphokines (en particulier l'IL-10), leurs analogues et leurs agonistes bien connus de l'homme du métier.

On entend par "analogues et agonistes" de ces molécules, d'autres molécules, ou des dérivés de ces molécules, agissant sur le même récepteur ou via le même mécanisme d'action que les produits spécifiques susmentionnés.

La présente invention concerne également un procédé de traitement thérapeutique ou prophylactique d'un patient comprenant l'étape d'administration de la composition selon l'invention audit patient de manière à modifier la réponse immunitaire du patient vis-à-vis d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune.

La présente invention sera décrite de manière plus détaillée en référence aux figures décrites dans les exemples d'exécution ci-dessous.

Exemples

A. Base du modèle considéré

a) Utilisation de la voie orale

L'administration orale permet une induction de tolérances immunologiques, et est appliquée de façon de plus en plus étendue dans le domaine de la désensibilisation anti-allergique. Elle demande cependant l'usage de quantités plus importantes d'antigènes que par voie parentérale, et doit s'étendre sur des périodes d'au moins plusieurs années (2, 3). L'optimisation du régime des doses administrée et de leur périodicité est adaptable par l'homme du métier de manière à éviter les réactions syndromiques (réplication de la symptomatologie allergique en cas de surdosage), qui sont fréquentes mais non dangereuses en raison de la progressivité lente de l'augmentation des doses administrées (2).

b) Utilisation de complexes peptides-protéines de stress

Les protéines de stress (heat shock proteins (HSP)) constituent une série de familles de protéines, très bien conservées durant l'évolution depuis les bactéries jusqu'à l'homme, et qui ont la capacité de se lier aux peptides ou aux protéines dont la structure conformationnelle est altérée ou en voie de conformation définitive (4).

Elles ont plusieurs rôles dont la participation au transport intracellulaire menant à l'assemblage polypeptidique pour la synthèse de certaines protéines ou leur élimination. Certaines sont exprimées à la surface de différentes cellules et peuvent contribuer à la présentation antigénique, en particulier à des lymphocytes T aux récepteurs pour antigène de type gamma-delta, qui colonisent les muqueuses et les organes lymphoïdes associés à la muqueuse digestive.

La présentation antigénique par l'intermédiaire des HSP de la famille HSP70, aux lymphocytes T gamma-delta (γ , δ) permet de se passer de la présentation dépendante du complexe majeur d'histocompatibilité de type II.

L'injection parentérale à des animaux d'expérience de complexes HSP-peptides permet d'obtenir un effet adjuvant remarquable (5, 6) déterminant ou amplifiant le pouvoir antigénique de ces peptides.

Certaines HSP de bactéries des familles HSP60 et HSP70 sont la cible de réponses immunes qui ont un rôle protecteur à l'égard de l'infection par ces germes.

Il a été proposé récemment de désensibiliser par voie orale en donnant des extraits peptidiques d'E. Coli contenant de la HSP60, à des patients atteint

d'arthrite rhumatoïde, avec un certain effet bénéfique (5, 6). Considérant le peu d'effet secondaire, les auteurs proposent de tenter l'essai sur d'autres affections inflammatoires pour manipuler une réponse dirigée contre l'une de ces HSP microbiennes elle-même, considérée comme substitut d'un auto-antigène.

De manière inattendue, les Inventeurs ont découvert que les protéines de stress constituaient un vecteur remarquable pour présenter des peptides au système lymphoïde du tube digestif et induire une tolérance. Les protéines de stress des bactéries saprophytes semblent être les plus abondantes naturellement dans la lumière digestive. Il est probable aussi que les peptides issus de la digestion alimentaire constituent la masse la plus abondante des fragments antigéniques disponibles à la formation de complexes HSP-peptides. Cependant, l'abondance des peptides générés, et la quantité présumée limitée des HSP bactériennes rend aléatoire la formation d'une quantité immunologiquement efficiente de ces complexes HSP-peptides antigéniques, et ceci d'autant que la quantité absorbée d'antigène à visée désensibilisante est très faible (quelques dizaines de μg), en regard de la charge protéique alimentaire.

Les Inventeurs ont proposé de favoriser la formation de ces complexes avant l'arrivée dans le tube digestif, c'est à dire in vitro, en utilisant des protéines de stress de E. Coli purifiées et des peptides issus de la digestion pepsinique de la BLG.

c) Utilisation de tests de compétition entre anticorps
sériques et monoclonaux pour la BLG

Les deux anticorps monoclonaux dénommés
ci-après M6 et M7 reconnaissent chacun un épitope
5 conformationnel différent sur la molécule de BLG. On
utilise leurs propriétés qualitatives différentes comme
marqueur de reconnaissance d'épitopes singuliers dans une
compétition avec l'ensemble des anticorps sériques d'un
sujet. Il ressort d'études cliniques que les sujets
10 symptomatiques et les sujets asymptomatiques reconnaissent
sur cette molécule des épitopes qui pour une part au moins,
sont différents (7), ce que l'on dénomme ci-dessous les
profils épitopiques.

L'épitope reconnu par M6 est particulièrement
15 bien reconnu par les sujets allergiques et symptomatiques.
La fixation de l'anticorps M6 sur la BLG intacte est en
effet mieux inhibée par les sérums d'enfants allergiques au
lait que ceux de sujets non allergiques, qu'il s'agisse
d'enfants ou d'adultes en bonne santé (donneurs de sang).

20 L'épitope reconnu par M7 est mieux reconnu
par les sujets asymptomatiques que par les sujet
allergiques. La fixation de l'anticorps M7 sur la BLG est
mieux inhibée par les sujets asymptomatiques que par les
sujets allergiques.

25 On utilise la compétition de liaison
antigénique contre M6 comme indice de spécificité
représentant du profil d'épitopes reconnu par les sujets
allergiques, et complémentaiement la compétition contre M7
comme indice de spécificité représentant du profil
30 d'épitopes reconnu par les sujets asymptomatiques.

La validation de cette interprétation a été
confirmée longitudinalement par des études cliniques.

L'acquisition d'un état de tolérance au lait s'accompagne d'une conversion de la spécificité fine des anticorps sériques, vers le profil typique des sujets asymptomatiques.

5 C'est cette discrimination d'épitopes exprimée à l'échelon des anticorps circulants qui sert ici d'outil d'analyse pour l'influence de la modulation antigénique orale.

10 B. Modèle expérimental

Des souris syngéniques ont reçu, dans leur eau de boisson, de très faibles quantités de peptides issus de la digestion pepsinique de bêta-lactoglobuline (BLG) préalablement couplés ou non avec des protéines de stress
15 purifiées et dont la capacité fonctionnelle était intacte (capacité de se lier à des peptides ou des protéines altérées).

a) Origine animale et conditions d'élevage

20 40 individus de 8 à 16 semaines ont été prélevés dans un élevage de souris Balbc soumises depuis plusieurs générations à une alimentation pauvre en lait de vache : 30 µg de bêta-lactoglobuline / gramme de granulés nutritifs.

25

b) Préparation des complexes antiqéniques

La BLG a été digérée au contact de pepsine couplée à de l'agarose (Sigma) dans des conditions de digestion incomplète, puis filtrée sur filtre de 10000
30 Daltons. La concentration du produit de digestion (pB) a été mesurée par spectrophotométrie (rendement de 30 à 50% de la protéine intacte).

Des solutions en tampon phosphate (PBS) de 1 µg/ml ont été incubées avec des solutions de 1 µg/ml des protéines de stress des E. Coli suivantes : DnaK, DnaJ, GroEL, GrpE (Stressgen) pendant une heure au moins à 5 température ordinaire. Des aliquots de 1 ml de chaque combinaison ont été congelés.

c) Groupes de traitement et posologie des complexes par voie orale

10 Une solution de complexes (1 ml) a été ajoutée, après dégel, au biberon d'eau de 100 ml quotidiennement distribué pour chaque cage de quatre souris. Chaque type de complexe est administré à 8 souris. Un groupe contrôle reçoit de l'antigène pB non complexé.

15 La solution a été ajoutée 3 fois par semaine durant deux semaines (soit six fois), à partir du temps zéro.

d) Réponse anticorps

20 Un prélèvement individuel de sang a été réalisé dans le plexus rétro-orbitaire au temps zéro et après 4 semaines. Les animaux sont anesthésiés à l'éther puis exsanguinés, au bout de 8 semaines.

La spécificité des anticorps sériques a été
25 examinée par un test de compétition de type ELISA.

e) Test de spécificité d'anticorps par compétition

Des plaques multipuits en polystyrène sont passivement recouvertes, par absorption à température
30 ordinaire, d'une faible quantité de BLG (0,3 µg/ml en tampon bicarbonate), puis saturées par de la gélatine (1%, poids/vol - Haemacel (R)).

15

Le sérum de souris est dilué au 1/100 en tampon de dilution (PBSdil) constitué de : PBS-EDTA (10 mM) - Tween 20 (0,05%) - gélatine (Haemacel-1%).

Deux anticorps monoclonaux de souris produits
5 ont été sélectionnés pour leur spécificité à l'égard d'épitopes conformationnels de la BLG. Ils ont été biotinés et sont utilisés à leur dilution limite de fixation antigénique définie de la façon suivante : celle qui permet un signal maximal mais sensible à toute réduction de la
10 charge en antigène, à sa propre dilution, et inhibable par la compétition avec un pool de sérums de souris non traitées. Celles-ci produisent en effet des anticorps naturels contre la BLG, en relation avec l'exposition antigénique alimentaire, même minime.

15 100 µl de sérum dilué et d'anticorps biotiné sont mélangés dans un puits, en double exemplaire.

Après une incubation d'une nuit à température ordinaire, la fixation de l'anticorps monoclonal est mesurée par la rétention proportionnelle de biotine révélée
20 par captation de streptavidine couplée à de la peroxydase de raifort. Celle-ci colore un substrat d'orthophénylène diamine. La densité optique (D.O.) est mesurée par spectrophotométrie. Le bruit de fond (b.f) est mesuré dans des puits sans antigène. La fixation maximale est définie
25 soit en l'absence de compétition (anticorps monoclonal seul), soit en présence de sérum particulièrement peu inhibiteur.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'inhibition de fixation de l'anticorps monoclonal par :
30 % inhib= $100 \times (D.O. \text{ du test} - D.O. \text{ b.f.}) / (D.O. \text{ maximale} - D.O. \text{ b.f.})$

La correspondance entre profil d'épitopes reconnus sur l'antigène et l'état clinique du sujet (tolérance ou pas) est confirmée par d'autres exemples :

- modèle d'allergie aux acariens :

5 l'évolution de la spécificité fine des anticorps anti-acariens chez des enfants allergiques montre l'existence d'un profil d'épitopes sous l'effet de la désensibilisation induite tant par voie parentérale qu'orale,

10 - l'évolution des anticorps

g) Résultats

La figure 1 résume les données de l'expérimentation :

15

Inhibition de l'anticorps M6

Sur la partie gauche, sont représentées les évolutions des moyennes d'inhibition (+ écart type) de la fixation de l'anticorps monoclonal M6 par les sérums
20 individuels, pour les différents groupes de traitement.

Les données chiffrées sont reprises dans le tableau 1.

Le groupe contrôle recevant les peptides digérés à la pepsine (pB) voit sa capacité moyenne
25 d'inhibition augmenter de 45 à 60% et 59% après 4 et 8 semaines. Cette variation est significative ($p < 0.05$ - test T pairé) par rapport au départ, mais stable après 4 semaines.

Pour le groupe recevant les complexes de
30 DnaK-pB, cette capacité passe de 48 à 56% puis 77% sur la même période, cette dernière étant plus importante que dans le groupe contrôle ($p < 0.01$ - test T non pairé) et très

significative par rapport au temps zéro ($p < 0.001$ - T pairé).

De même, les groupes recevant les complexes DnaJ-pB, GroEL-pB et GrpE-pB montrent une élévation très
5 significative après 4 semaines et qui s'accroît encore à la huitième semaine (située bien au dessus de la valeur du groupe contrôle pour les complexes GroEL-pB et GrpE-pB au moment correspondant).

10 Inhibition de l'anticorps M7

Sur la partie droite de la figure 1, sont représentées les évolutions des moyennes d'inhibition (+
écart type) de la fixation de l'anticorps monoclonal M7, par les sérums individuels, pour les différents groupes
15 traités.

Les données chiffrées sont reprises dans le tableau 2.

Le groupe contrôle recevant les peptides de BLG digérés par pepsine (pB) ont une capacité moyenne
20 d'inhibition qui diminue de 70 à 52% et 57% en 4 et 8 semaines. Cette variation est significative ($p < 0.01$ - test T pairé), quoique stable après 4 semaines.

Pour le groupe recevant les complexes DnaK-pB, cette capacité se réduit déjà significativement à la
25 quatrième semaine, en passant de 68 à 51%, comme dans le groupe contrôle.

Mais le résultat s'effondre à 17% à la huitième semaine ($p < 0.001$ - T pairé), ce qui est nettement
inférieur à celui du groupe contrôle pour le prélèvement
30 correspondant ($p < 0.01$ - test T non pairé).

L'évolution est parallèle à celle-ci pour le groupe traité avec les complexes de DnaJ-pB.

Pour le groupe recevant des complexes de GroEL-pB, la réduction du pouvoir inhibiteur est d'emblée maximale, atteignant les 28% dès la quatrième semaine, et demeure au même niveau, de 30% à la huitième semaine.

5 Dans le groupe recevant des complexes GrpE-pB, la réduction du pouvoir inhibiteur est aussi d'emblée maximale, passant de 72 à 22% dès la quatrième semaine, mais semble s'amenuiser ensuite en revenant à un taux moyen de 41%.

10

h) Conclusion

L'administration de peptides issus de la digestion enzymatique d'un antigène majeur du lait, en l'occurrence la bêta-lactoglobuline, sous la forme de
15 complexes liés à des protéines de stress selon l'invention, et par la voie orale, entraîne une modification radicale et très rapide du profil des épitopes reconnus par les anticorps circulants. Ces anticorps sont présents naturellement chez tous les sujets exposés à l'antigène par
20 leur alimentation. Dans un modèle de souris, exposées chroniquement à une quantité faible de l'antigène par cette voie, la dose d'antigène administrée durant un bref laps de temps est très faible, loin en dessous de la quantité ingérée naturellement (estimation 0,25 µg par sujet et par
25 jour de traitement sous forme de complexes et 150 µg par sujet et par jour dans l'alimentation courante).

La rapidité du changement est d'autant plus remarquable que la demi-vie des anticorps sériques, principalement des IgG est de 3 semaines, ce qui signifie
30 qu'à la huitième semaine, il devrait encore subsister le quart des anticorps présents à la fin du traitement de seulement 2 semaines. Toutes les protéines de stress

utilisées ont été efficaces. Dans une deuxième expérience avec des complexes DnaK-pB, une tentative de déterminer une dose limite inférieure n'a pas abouti malgré l'usage de doses jusqu'à 10 fois inférieures (0,1 µg / biberon de 100 ml / 3 jours par semaine).

C. Tolérance induite oralement à l'égard d'antigènes d'histocompatibilité majeurs

1. Modèle expérimental

Des animaux syngéniques (souris Balbc) reçoivent une préparation protéique dissoute dans leur eau de boisson. Elle contient des fragments d'antigènes d'histocompatibilité de souris syngéniques d'une autre souche, dont elles rejetteraient toute greffe (souris C3H).

L'effet tolérogène est attendu de manière renforcée lorsque ces fragments sont associés à une protéine de stress de bactérie (ici Dnak de E. Coli).

A titre de contrôle, un groupe de souris recevra de la même manière un complexe de Dnak avec des fragments peptidiques, obtenus de façon analogue, à partir de la bêta-lactoglobuline (antigène majeur du lait).

On devrait s'attendre à ce que la sensibilisation orale doit atténuer de façon spécifique la réactivité lymphocytaire à l'égard d'une souche de lymphocytes étrangers du même type que ceux utilisés pour la préparation orale et non vis-à-vis d'une troisième souche non apparentée.

2. Matériel et méthode

a) animaux :

3 groupes de 12 souris sont prélevées dans un élevage de souris syngéniques de souche Balbc sont élevées par cages

de 6 animaux. Chaque groupe reçoit pendant 2 semaines une des préparations suivantes dans le biberon d'eau de boisson à raison de 3 distributions par semaine (un jour sur deux et pas le week-end) et une dose de 1 μ g de complexe pour 100 ml d'eau :

- un complexe de Dnak-peptides de bêta-lactoglobuline (préparation contrôle)
- une solution de peptides de membrane lymphocytaire splénique de souris C3H digérée à la pepsine (contenant des fragment d'antigènes d'histocompatibilité)
- un complexe de ces peptides associé au Dnak purifié de E. Coli (Stressgen)

b) test de tolérance acquise (in vitro)

Ce test est basé sur une culture lymphocytaire mixte unidirectionnelle.

Les cellules répondeuses sont isolées à partir de la rate des animaux à tester. Les cellules lympho-monocytaires sont obtenues après centrifugation sur gradient de densité avec un mélange de ficoll-isopaque (Pharmacia). Elles sont resuspendues à l'aide de 4 millions de cellules/ml en milieu de culture RPMI 1640 tamponné à l'Hepes et au bicarbonate, supplémenté de 2-mercaptoéthanol, glutamine, géomycine, et 10% de sérum de veau.

Les cellules stimulantes sont obtenues de la même manière de souris de souches différentes au niveau de leur MHC : la souche C3H et une souche domestique (DOM).

Elles sont incubées pendant une heure en présence de mitomycine afin de bloquer leur potentiel de multiplication. Elles sont ensuite resuspendues dans les mêmes conditions que les cellules répondeuses.

Culture lymphocytaire:

Un volume égal de suspension (0,1 ml) de cellules répondeuses et de cellules stimulantes sont mélangés, en 3 exemplaires, dans des puits à fond rond de plaques multipuits de culture en polystyrène pour être ensuite incubées durant 5 jours dans un incubateur à air/CO₂ (95/5%; vol/vol), humidifié, à 37,5 °C.

Chaque puits de microculture recevra 2 µC de thymidine tritiée à 2 C/mM (Amersham) 16 heures avant l'arrêt de la culture qui se réalise à l'aide d'un appareil MASH II qui filtre chaque microculture sur une membrane de fibres de verre qui retient les noyaux cellulaires.

La radioactivité nucléaire de chaque culot, qui reflète l'incorporation de novo de thymidine dans de l'ADN, est mesurée par comptage en scintillation liquide (Packard Tricarb).

Les résultats sont exprimés en Coups Par Minute et représentent la moyenne de 3 échantillons de la même culture à l'échelon individuel.

20

c) planification expérimentale

Les prélèvements ont lieu à 2 moments différents :

- durant la 3ème semaine qui suit le début de l'administration orale d'une des préparations,
- 25 - durant la 7ème semaine.

Les animaux sont sacrifiés en 3 fois par période .

Chaque expérience de culture comporte 2 animaux par groupe traité.

La culture lymphocytaire mixte est réalisée parallèlement :

- 30 a) vis-à-vis de cellules mitomycinées d'origine C3H
- b) vis-à-vis de cellules mitomycinées d'origine DOM

d) préparation des peptides

Des lymphocytes (20 millions) d'une souche de souris appropriée, sont isolés à partir de la rate. Il s'agit d'un mélange de lymphocyte T et B en quantités
5 approximativement égales et donc porteurs des antigènes de type I et II. Ils sont traités par ultrasons (3 x 10 sec) puis centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté et recentrifugé de la même façon. Ensuite, le surnageant est centrifugé à 2 reprises à 8000 g. Le dernier
10 surnageant est enrichi en membranes cellulaires et débarrassé de débris de noyau cellulaire et d'appareil de Golgi. Il est soumis ensuite à une digestion par pepsine couplée à des billes d'agarose, à pH 2 en tampon glycine, pendant 1 heure 30 et à 37°C. Après centrifugation douce
15 pour séparer les billes d'agarose, et neutralisation à pH 7 par tampon TRIS, le mélange est filtré sur filtre (Millipore limite 10 kD). Le rendement est de l'ordre 500 µg de peptide (détermination par spectrophotométrie) dénommé LMp.

20 Une solution de 50 µg de peptide est mélangée à une solution de 50µg de Dnak (Stressgen) pour former un complexe Dnak-LMp.

Le complexe Dnak avec peptide de bêta-lactoglobuline (Bp) est constitué de la même manière en
25 utilisant des peptides issus de la digestion pepsinique de bêta-lactoglobuline purifiée (cf. supra).

3. RésultatsAu bout de 3 semaines de traitement (figure 2)

30 Le groupe de souris ayant reçu le complexe Dnak-LMp répond le moins bien à la stimulation de cellules C3H mitomycinées (C3Hm).

Ceci est différent ($p < 0.02$; T-test) du groupe qui a reçu le peptide Lmp seul, et également celui qui a reçu le complexe témoin Dnak-Bp ($p < 0.01$; T-test).

Il faut cependant noter que l'administration
5 du peptide seul (sans Dnak) a également un effet, puisque ce groupe est significativement moins répondeur que le groupe témoin ($p < 0.01$; T-test).

Toutefois, la spécificité de l'inhibition de
réponse est garantie par le fait que la réactivité
10 lymphocytaire des trois groupes est équivalentes à l'égard de cellules mitomycinées d'une troisième souche, non apparentée (DOMm).

Au bout de 7 semaines (figure 3), soit 4 semaines après
15 l'arrêt de l'administration orale

Les différences entre les 3 groupes restent bien marquées. Le groupe traité au Dnak-Lmp est le plus inhibé tant à l'égard de celui qui a reçu le peptide membranaire seulement ($p < 0.02$; T-test) que le groupe témoin
20 ($p < 0.01$; T-test).

L'administration du peptide seul permet encore une atténuation de réponse vis-à-vis du groupe témoin ($p < 0.01$; T-test).

La spécificité de la réponse est encore une
25 fois vérifiée par le test parallèle vis-à-vis des cellules mitomycinées d'une souche non apparentée (DOMm) et où les 3 groupes traités différemment réagissent de la même façon.

L'administration de peptides obtenus par
30 digestion pepsiniques de lymphocytes spléniques de souches de souris caractérisées par une incompatibilité dans le système H-2 tant aux niveaux K et D que A-E en quantités

extrêmement faibles et pendant deux semaines, a pour effet d'atténuer fortement la réponse inconditionnelle de lymphocytes immuno-compétents, in vitro, qui signe d'habitude cette incompatibilité.

- 5 Cette atténuation est renforcée par la présentation de ce type de peptide sous la forme de complexes peptides-Dnak.

 Cette atténuation est spécifique et n'atteint en rien la capacité de réponse à l'égard d'une variété
10 différente, sans relation avec la souche utilisée pour la tolérisation.

D. Tolérance des souris syngéniques à l'égard d'une greffe de cellules allogéniques

- 15 1. Modèle et schéma expérimental

Souches de souris :

- Balbc pour les animaux rendus tolérants
- C3H pour les animaux donneurs de cellules à greffer (allogéniques) et de cellules stimulantes en culture
20 lymphocytaire mixte (MLC)

Elles sont élevées en cages de 6 animaux.
Chaque groupe est constitué de 12 animaux par traitement.

Le traitement oral est effectué selon le protocole précédent.

25

Schéma expérimental :

Complexes administrés dans l'eau de boisson :

jours 0, 2, 4, 7, 9

Greffe allogénique : 20×10^6 cellules spléniques de C3H en
30 intra-péritonéal :

jour 16

Sacrifice, collecte de rates et mise en culture des cellules spléniques :

15 semaines après la greffe

5 Détection et numération des cellules allogéniques

a) Par la présence de cellules porteuses de MHC type II

Test fonctionnel en culture mixte syngénique bidirectionnelle

Les cellules spléniques de souris traitées et greffées sont mises en culture avec des cellules de souris syngéniques (Balbc) non traitées (naïves).

Normalement, il n'y a aucune réponse proliférative à attendre si le contenu des cellules spléniques d'animaux traités et greffés est uniquement composé de cellules syngéniques.

Par contre, la présence de cellules allogéniques, signalant la prise de greffe in vivo, devrait entraîner une prolifération de type MLC par les cellules dites naïves, non tolérantes, d'autant plus importante que le nombre de cellules étrangères est élevé.

Pour évaluer l'ordre de grandeur de la prise de greffe, une tentative de quantification relative de la réponse est effectuée par référence à une courbe dose/réponse obtenue en ajoutant des quantités connues et croissantes de cellules allogéniques C3H à une quantité identique de cellules naïves et répondeuses (200×10^3 cellules/puits).

b) Par la présence de cellules porteuses de MHC type I

Numération directe par immunofluorescence en cytofluorométrie de flux en utilisant un anticorps monoclonal de souris spécifique du MHC type I de la souris

C3H : H-2 kk (Serotec), couplé à la fluorescéine ou à la phycoérythrine sur une suspension de cellules spléniques.

2. Résultats

5 Comme présenté dans la figure 4, 15 semaines après la greffe péritonéale, les cellules spléniques du groupe traité par complexes DnaK-peptides de membranes lymphomonocytaires de souris C3H sont incapables de répondre à la stimulation par cellules C3H mitomycinées.
10 Ceci témoigne de l'induction d'une tolérance allogénique.

Le groupe traité par le peptide seul est également toléré dans une moindre mesure.

Le groupe traité par DnaK-peptide de bêtalactoglobuline n'est pas tolérant du tout.

15 Par ailleurs, les cultures mixtes stimulées par une autre population allogénique provenant d'une souche histoincompatible différente de C3H, sont toutes semblables. Ceci témoigne de ce qu'aucun traitement n'a altéré ni différencié la capacité de réponse en MLC, et que
20 l'effet du traitement est bien spécifique de la souche de souris dont proviennent les peptides de membranes.

Comme représenté dans la figure 5, on utilise la réponse en MLC de cellules d'animaux ni traités, ni greffés, pour révéler l'existence de cellules étrangères
25 dans un mélange de cellules spléniques d'animaux greffés, qui seraient donc ici d'origine C3H.

Il apparaît que les rates de souris traitées oralement avant la greffe par LMP et DnaK-LMP contiennent des éléments allogéniques puisqu'elles donnent lieu à une
30 réponse proliférative très significativement différente de la réponse du groupe contrôlé traité par un complexe DnaK-peptides irrelevants (bêtalactoglobuline). Ce dernier a une

réponse qui ne diffère pas du bruit de fond.

A titre comparatif, une série de cultures mixtes ont été menées parallèlement avec des quantités connues et croissantes de cellules C3H (figure 6). Elles
5 donnent lieu à une réponse proliférative proportionnelle à la quantité de cellules étrangères.

Le niveau de réponse moyen enregistré avec des cellules spléniques d'animaux greffés et tolérés par complexes DnaK-Lmp correspondrait à une teneur d'environ
10 30% de cellules C3H.

La présence de cellules du type greffé dans la rate est mesurée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique du MHC I de C3H (H-2kk) (table 5). Le groupe traité par DnaK-Lmp en contient 14.7% en moyenne,
15 valeur significativement supérieure à celle des deux autres groupes.

Cette présence d'allo-antigènes n'est observable qu'à la condition de laisser reposer les cellules spléniques d'animaux greffés pendant au moins une
20 suit à 37 °C en l'absence de sérum. ceci suggère qu'il est indispensable de permettre la réexpression de ces antigènes dont la présence serait ainsi modulée in vivo, vraisemblablement par des anticorps anti-H-2kk. Ceci ajoute un autre mécanisme de tolérance de la greffe à la tolérance
25 purement adressée aux cellules T répondeuses.

Table 1

Inhibitions de l'anticorps monoclonal M6 liant le nBLG par des sérums de souris individuels : évolution en fonction du temps en fonction le type de complexe administré oralement.

5

		% d'inhibition de la liaison de M6		
		Moyenne	Déviations standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	45.0100	8.4146	8
PREL	2	60.6750	3.9304	8
PREL	3	59.6338	17.4714	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	48.4350	7.0540	8
PREL	2	56.3675	5.6146	8
PREL	3	77.0975	3.8966	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	23.7350	15.3990	8
PREL	2	65.7013	6.2958	8
PREL	3	65.3863	4.7270	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	24.9538	4.7972	8
PREL	2	56.0100	4.3929	8
PREL	3	80.0287	1.9401	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	37.3313	6.4248	8
PREL	2	56.6962	5.5641	8
PREL	3	87.1525	7.8731	8

Table 2

Inhibitions de l'anticorps monoclonal M7 liant le nBLG par des sérums de souris individuels : évolution en fonction du temps en fonction le type de complexe administré oralement

5

		% d'inhibition de la liaison de M7		
		Moyenne	Déviations standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	70.0658	3.5541	8
PREL	2	52.8224	2.3458	8
PREL	3	57.0592	7.8996	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	68.9145	2.6698	8
PREL	2	51.6908	3.0857	8
PREL	3	17.2697	8.0473	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	78.4276	3.4832	8
PREL	2	50.8553	3.9778	8
PREL	3	26.9145	3.2069	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	73.9671	3.1679	8
PREL	2	28.5132	8.6072	8
PREL	3	30.2829	14.2174	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	72.8355	4.7722	8
PREL	2	22.2961	9.5040	8
PREL	3	41.3684	6.4331	8

Table 3

Titres d'anticorps anti (natif) nBLG après transformations logarithmiques : évolution en fonction du temps en fonction le type de complexe administré oralement.

5

		Ln de titres (A. U.)		
		Moyenne	Déviati on standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	3.8526	.4547	8
PREL	2	4.2162	.3395	8
PREL	3	4.2059	.2946	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	3.9738	.7957	8
PREL	2	4.3749	.6353	8
PREL	3	3.2562	.5057	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	3.7073	.4435	7
PREL	2	4.1348	.5475	8
PREL	3	4.3917	.5047	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	4.3714	.4215	8
PREL	2	3.6419	.4704	8
PREL	3	3.9964	.2724	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	4.1526	.6401	8
PREL	2	4.1739	.4464	8
PREL	3	3.6126	.4873	8

Table 4

Différences de l'inhibition entre la liaison des anticorps
M6 et M7 au nBLG :

		% d'inhibition de la liaison de M6 -% d'inhibition de la liaison de M7		
		Moyenne	Déviations standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	-25.0558	9.0035	8
PREL	2	7.8526	5.6470	8
PREL	3	2.5745	19.8676	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	-20.4795	8.5253	8
PREL	2	4.6767	6.1131	8
PREL	3	59.8278	9.2686	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	-54.6926	13.8705	8
PREL	2	14.8460	6.4665	8
PREL	3	38.4718	5.6903	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	-49.0134	3.9824	8
PREL	2	27.4968	10.6337	8
PREL	3	49.7459	14.6732	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	-35.5043	4.8959	8
PREL	2	34.4002	13.4093	8
PREL	3	45.7841	8.7931	8

Table 5

Cellules allogéniques persistantes (H-2kk +) dans les rates de souris Balbc greffées avec des cellules C3H :

Traitement oral					
DnaK-Bp		Lymphocyte Membrane peptide (Lmp) seul		DnaK-LMp	
1.0%		0.9%		14.2%	
1.5		2.8		25.0	
0.5		3.6		9.2	
0.5		3.7		10.4	
Moyenne ET		Moyenne ET		Moyenne ET	
0.9%	0.5	2.7%	1.3	14.7%	7.2

T-tests couplés :

DnaK-LMp / DnaK-Bp : $p = 0.026$

DnaK-LMp / LMp : $p = 0.052$

REFERENCES

1. Patterson, R. et al., *Allergy Proc.*, Vol. 15 (5), pp. 239-264 (1994)
2. Ferrick, D.A., *Mak-TW Tolerance and Self-Reactivity in V gamma 1.1 C gamma 4 transgenic mice*
3. Staines, U. et al., *J. Rheumatol.*, Vol. 54 (3), pp. 145-154 (1995)
4. Polla, B.S. et al., *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 23 (7), pp. 548-556 (1993)
- 10 5. Healy, A.M. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol 663, pp. 319-330 (1992)
6. Revillard, J.P. et al., *Dev. Biol. Stand.*, Vol. 77, pp. 31-37 (1992)
7. Bousquet, J. et al., *Allergy*, Vol. 49, pp. 31-36 (1994)

15

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire comprenant avec un véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire adéquat, une protéine de stress et au moins un des épitopes conformationnel ou séquentiel d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe ou une réaction allergique ou une réaction auto-immune.
2. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 1, caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire est adéquat pour une administration par voie mucosale ou par voie cutanée.
3. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine de stress et l'épitope forment un complexe.
4. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'épitope est obtenu par une hydrolyse avantageusement enzymatique, de préférence à la pepsine, de ladite structure antigénique.
5. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la protéine de stress est une protéine bactérienne de stress.
6. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 5, caractérisée en ce que la protéine bactérienne de stress est une protéine de stress d'une bactérie saprophyte.
7. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que la protéine de stress est une

protéine de stress d'E. Coli.

8. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 7, caractérisée en ce que la protéine de stress est choisie parmi le groupe
5 constitué par la protéine de stress GroEL, GrpE, DnaK, ou DNAJ.

9. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la structure
10 antigénique est un allergène choisi parmi le groupe constitué par les antigènes majeurs allergiques présents dans le lait, en particulier la bêta-lactoglobuline bovine (BLG) issue du lait de vache, les antigènes majeurs allergiques présents dans les végétaux, en particulier dans
15 les pollens, dans les poils d'animaux, dans les venins d'animaux, en particulier dans le venin de guêpe, les antigènes majeurs de la réaction allergique aux acariens, à la mite présente dans la poussière de maison (antigène P1 du Dermatophagoïdes pteronyssinus), l'antigène majeur de
20 l'Aspergillus fumigatus, l'entérotoxine B staphylococcalle (SEB) et le locus majeur d'histocompatibilité de type I ou II.

10. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications
25 précédentes caractérisée en ce qu'elle comporte un immunosuppresseur, de préférence choisi parmi le groupe constitué par l'azathioprine, les stéroïdes, les globulines anti-lymphocitaires, la cyclosporine A, la rapamycine, le KF506 (tacrolimus), ou des lymphokines, leurs analogues,
30 leurs agonistes ou un mélange d'entre eux.

11. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des

revendications précédentes pour la préparation d'un médicament destiné à modifier la réponse immunitaire d'un patient vis-à-vis d'une structure antigénique spécifique d'une pathologie liée à un rejet de greffe, une réaction
5 allergique ou une réaction auto-immune.

12. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 pour la préparation d'un médicament destiné à la désensibilisation d'allergies atopiques ou non
10 atopiques.

13. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des maladies auto-
15 immunes, en particulier les pathologies choisies parmi le groupe constitué par les infections liées au SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease), le syndrome Gougerot-Sjögren (ou pathologie Sjögren), la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que les pathologies du type sarcoidosis et osteopenia,
20 spondylarthritis, scleroderma, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, hyperthyroidism, maladie d'Addison, auto-immune haemolytic anaemia, maladie de Crohn, syndrome de Goddpasture, maladie de Graves, Hashimoto's thyroiditis, idiopathic purpura haemorrhagica,
25 diabètes insulino-dépendants, myasthenia, pemphigus vulgaris, pernicious anaemia, poststreptococcal glomerulonephritis, psoriasis et stérilité spontanée.

14. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention de rejets de greffe.
30

1/4

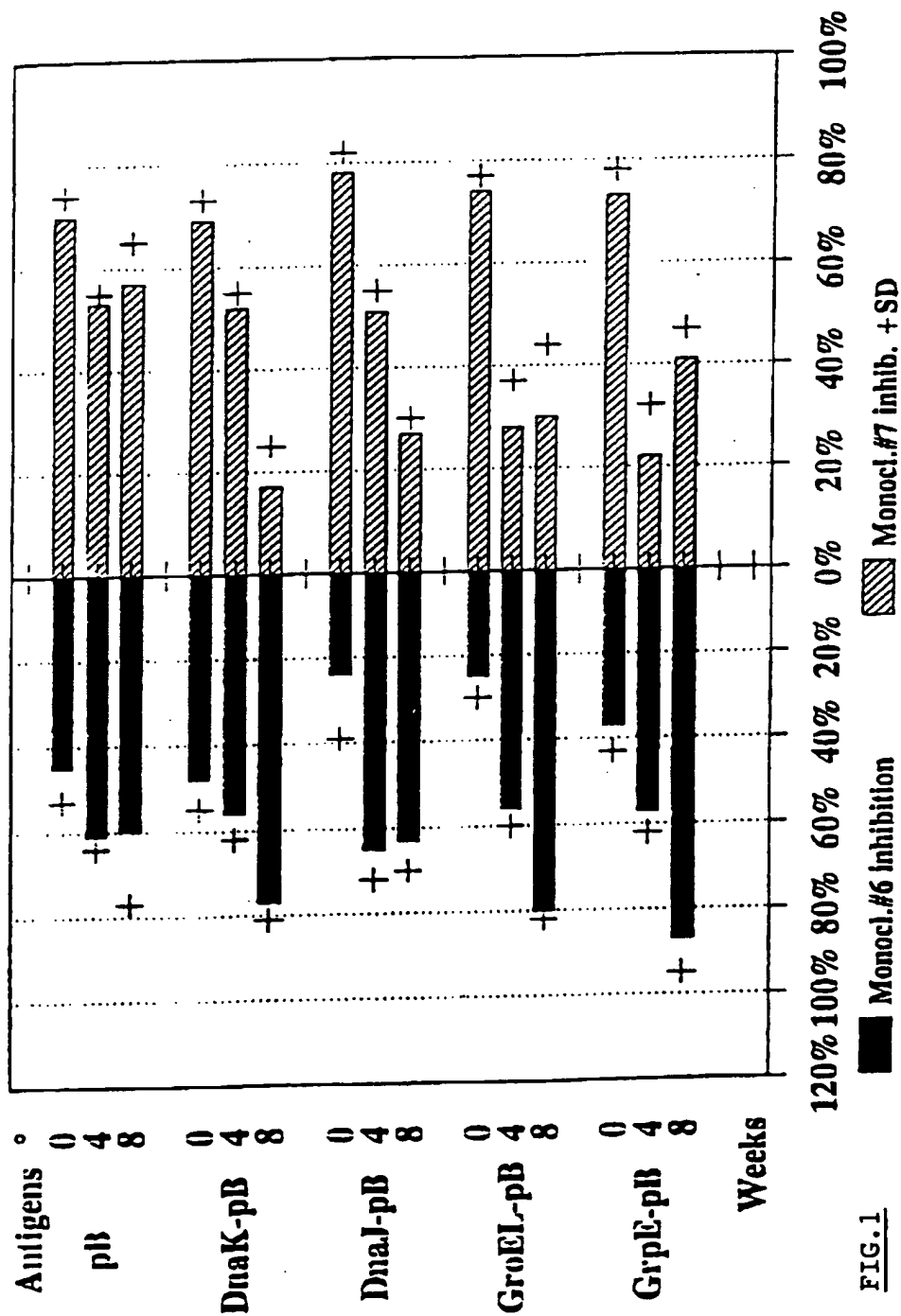
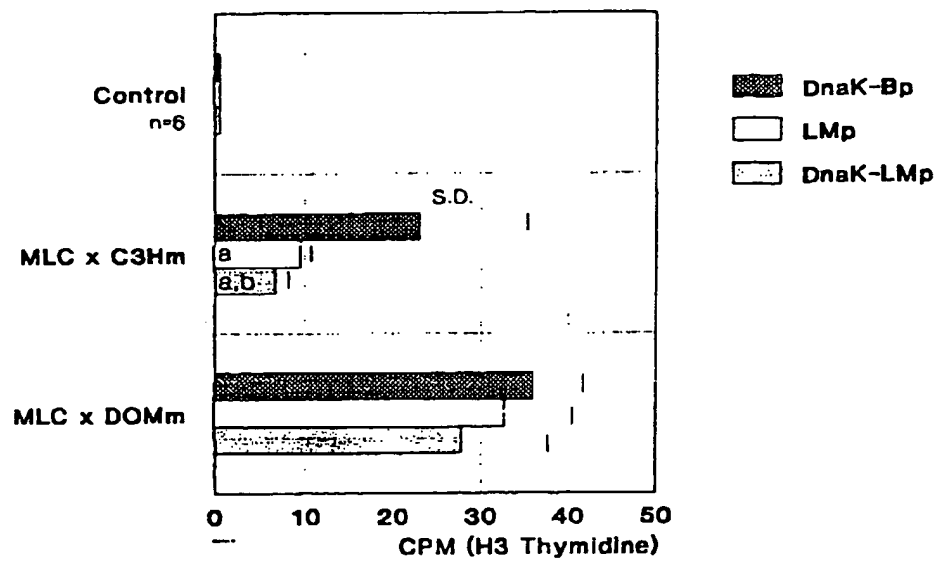
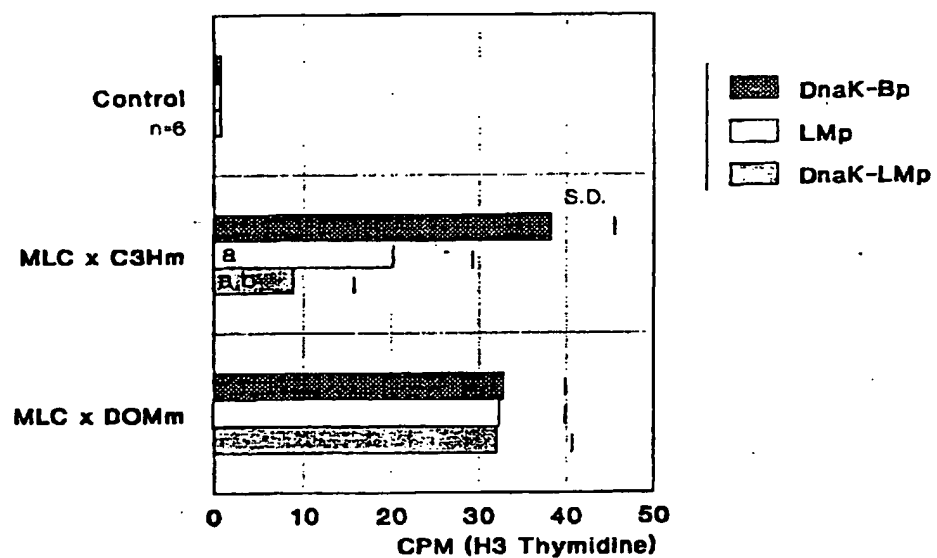
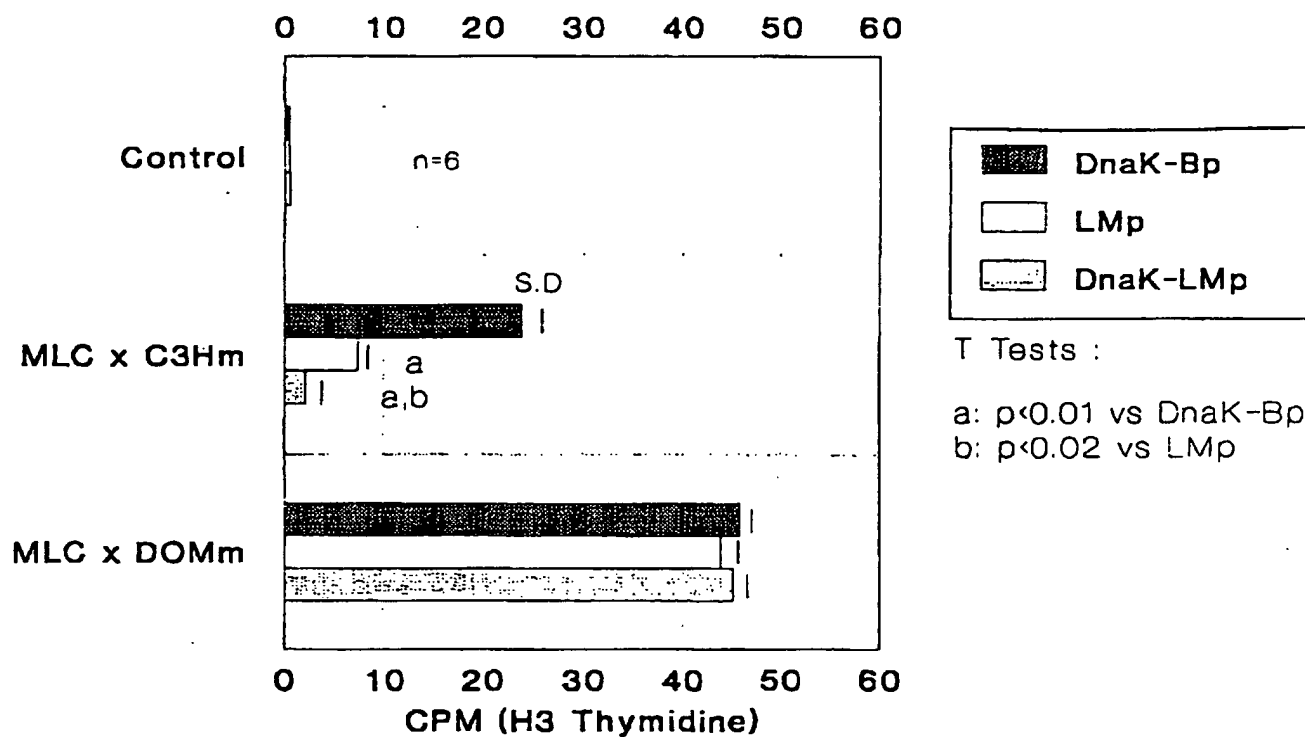


FIG. 1

2/4

**FIG. 2****FIG. 3**

**FIG.4**

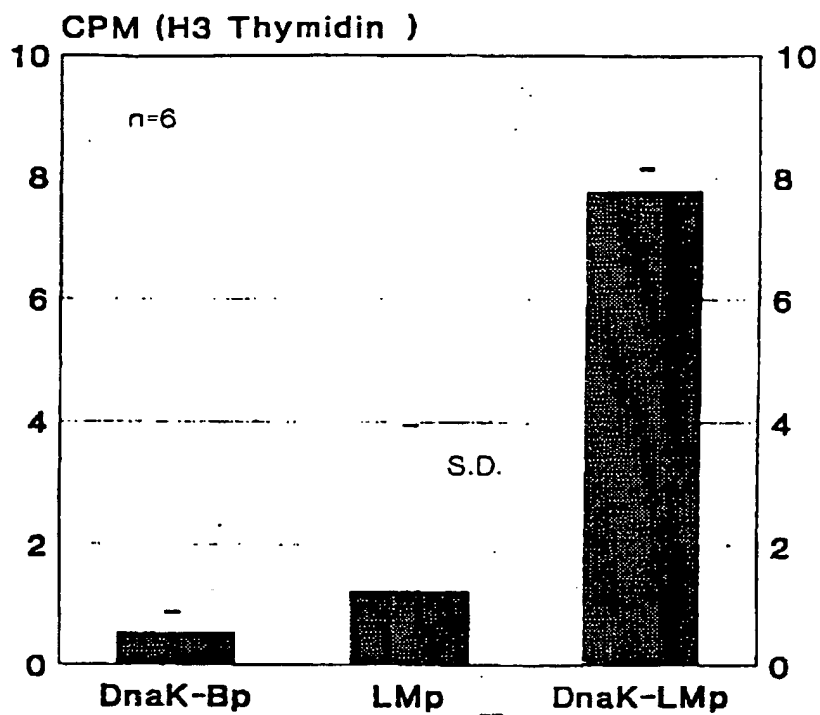


FIG.5

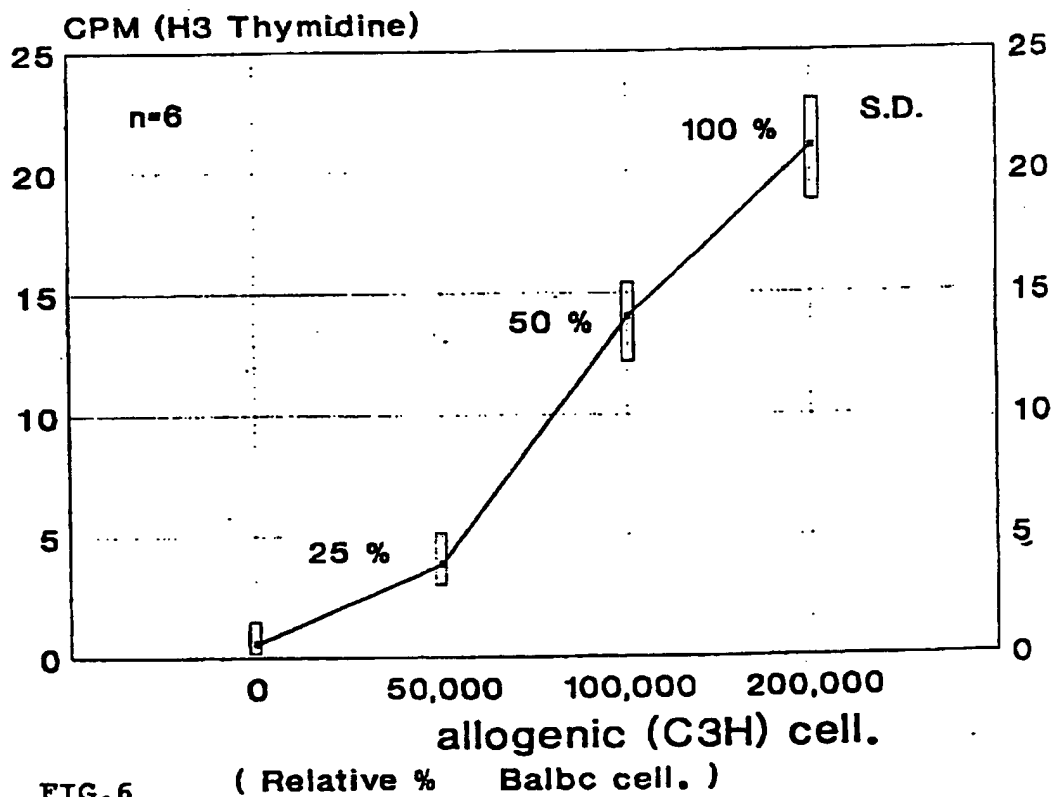


FIG.6